Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. R. Benecke

Langfristige Therapie mit Interferon-β 1a subkutan: Klinischer Verlauf und Genexpressionsveränderungen im Blut von Patienten mit schubförmig verlaufender Multipler Sklerose

Inauguraldissertation

zur Erlangung

des akademischen Grades Doktor der Medizin

der medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Christiane Hartmann

aus Rostock

geboren am 19.09.1983 in Hamburg

Rostock, 2012

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0055-7

1. Gutachter:

   Prof. Dr. med. Uwe Zettl, Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsklinik Rostock

2. Gutachter:

   Prof. Dr. med. Friedemann Paul, Charité – Universitätsmedizin Berlin

   Exzellenzcluster NeuroCure, NeuroCure Clinical Research Center

3. Gutachter:

   Prof. Dr. med. Jörn Peter Sieb, Chefarzt der Neurologie, Helios Klinik Stralsund

Datum der Einreichung: 04.09.2012

Datum der Verteidigung: 10.04.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Es kommt dabei durch Demyelinisierung und axonale Schädigung zu multiplen entzündlichen und sklerotischen Läsionen im Gehirn und Rückenmark. Die Erkrankung wird daher auch Encephalomyelitis disseminata genannt (Lassmann et al. 2001). Schon früh im Krankheitsverlauf treten irreversible Schäden auf, welche zu bleibenden Funktionseinschränkungen führen können. MS ist die häufigste, bereits in jungen Jahren zu bleibender Invalidität führende neurologische Erkrankung (Compston und Coles 2008).

1.1.1 Epidemiologie

Das Prädilektionsalter der MS liegt zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr. Dieses spiegelt allerdings das Alter bei Erstmanifestation neurologischer Symptome wider und nicht das Alter beim ersten Auftreten von klinisch stummen Entmarkungsherden im ZNS, welche schon unbemerkt Jahre zuvor auftreten können. Bei Frauen tritt die Erkrankung in Abhängigkeit von der Verlaufsform häufiger auf. Die schubförmige Verlaufsform betrifft Frauen dreimal häufiger als Männer. An der primär progredienten Verlaufsform leiden beide Geschlechter etwa gleich häufig (Greer und McCombe 2011). In Deutschland sind nach Schätzungen zwischen 120.000 und 140.000 Menschen von der Krankheit betroffen (Hein und Hopfenmüller 2000, Flachenecker et al. 2008) Das entspricht etwa 0,15-0,17% der Bevölkerung. Die Prävalenz ist geografisch ungleichmäßig verteilt. Es besteht ein höheres Erkrankungsrisiko für Menschen in den gemäßigten Breitengraden wie in Europa, Nordamerika und Australien als für Menschen in äquatornahen Regionen (Rosati 2001). Außerdem sind Menschen kaukasischen Ursprungs häufiger betroffen (Aguirre-Cruz et al. 2011). Darüber hinaus sind epidemieartige Häufungen in bestimmten Regionen beschrieben worden wie auf den Färöer-Inseln (Joensen 2010). Migrationsstudien haben gezeigt, dass Kinder bei Migration vor dem 15. Lebensjahr das MS-Erkrankungsrisiko des neuen Landes annehmen, wohingegen erwachsene Migranten das Erkrankungsrisiko des Herkunftslandes beibehalten (Gale und Martyn 1995, Ascherio und Munger 2007a).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist nach wie vor ungeklärt. Nach heutigem Erkenntnisstand wird eine multifaktoriell bedingte Immunreaktion angenommen, bei der sich Entzündungszellen gegen körpereigenes Myeloprotein richten. Dabei scheinen sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren, insbesondere die Exposition gegenüber Viren, eine Rolle zu spielen (Ascherio und Munger 2007a, b). Das Risiko von Verwandten MS-kranker Patienten ebenfalls an MS zu erkranken, steigt, je enger das Verwandtschaftsverhältnis ist (Robertson et al. 1996a, b), und ist mit ca. 25% am höchsten bei monozygoten Zwillingen (Mumford et al. 1994). Es konnte jedoch kein einheitlicher Vererbungsmodus festgestellt werden. Vielmehr wird vermutet, dass eine Kombination aus verschiedenen Genmerkmalen für die Entwicklung einer MS prädisponierend wirkt. Eine Assoziation mit bestimmten Genen konnte nachgewiesen werden, insbesondere wurden Gen-Polymorphismen der HLA-Gene (Humanes Leukozyten-Antigen) wie HLA-DRB1*1501 beschrieben, die bei MS-Kranken häufiger als in der Gesamtbevölkerung auftreten (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2011). Die genetische Komponente kann eine familiäre Krankheitshäufung erklären, nicht jedoch, warum sich das Erkrankungsrisiko bei Migration verändert. Dies spricht eher für einen starken Einfluss von Umweltfaktoren auf die Krankheitsentstehung. Hier wird ein Zusammenhang mit einer in der Kindheit aufgetretenen Infektion durch einen Erreger vermutet, welcher eine Kreuzreaktivität mit Bestandteilen der Myelinscheide aufweist (Ascherio und Munger 2007a). Ein spezifischer Erregernachweis konnte bisher nicht erbracht werden, jedoch wurde der Nachweis einer Immunreaktion gegen Epstein-Barr-Virus bei Patienten mit im Kindesalter auftretender MS häufiger als bei Gesunden beschrieben (Haahr und Höllsberg 2006, Banwell et al. 2007). Als weiterer Einflussfaktor konnte Nikotin identifiziert werden. Rauchen erhöht das Risiko, an einer MS zu erkranken, um den Faktor 1,2 bis 1,5 (Hawkes 2007) und ist ein Risikofaktor für die Ausbildung einer definitiven MS nach klinisch isoliertem Syndrom (Di Pauli et al. 2008). Es wird des Weiteren angenommen, dass Vitamin D einen Einfluss auf die Erkrankung hat. Ein hoher Vitamin D-Spiegel im Blut konnte mit einer geringeren Rate an MS-Erkrankungen korreliert werden, wobei der genaue Zusammenhang noch nicht geklärt ist (Ascherio et al. 2010, Pierrot-Deseilligny und Souberbielle 2010).

Insgesamt geht man heute von einer multifaktoriellen Genese aus, bei der es in genetisch

suszeptiblen Individuen unter dem Einfluss verschiedener Umwelteinflüsse zu einer Immunreaktion gegen körpereigene ZNS-Strukturen kommt (Sospedra und Martin 2005, Compston und Cole 2008, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2011).

Pathophysiologisch kommt es zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten im peripheren lymphatischen Gewebe. Dabei handelt es sich um CD4+-T-Lymphozyten und CD8+-zytotoxische T-Lymphozyten. Die Mechanismen, die zur Aktivierung führen, sind bisher noch nicht im Detail geklärt. Möglicherweise erfolgt diese Aktivierung durch einen exogenen Trigger, z.B. ein Virus-Antigen, welches durch molekulares Mimikry einem körpereigenen Antigen ähnlich ist (Von Herrath et al. 2003). Als Folge der Aktivierung exprimieren die autoreaktiven T-Lymphozyten Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche, mit deren Unterstützung sie die Blut-Hirn-Schranke (*Blood Brain Barrier,* BBB) passieren können (Hickey 1991). Innerhalb des ZNS erkennen die Enzündungszellen körpereigene Strukturen als spezifische Antigene. Als mögliche Antigene werden Proteinstrukturen und/oder Lipidstrukturen der Myelinscheiden postuliert. Ein durch autoreaktive T-Lymphozyten erkennbares Antigen ist das basische Myelinprotein (*myelin basic protein,* MBP), jedoch wurden im Tiermodell der MS auch andere Encephalitis auslösende Antigene gefunden, die bei der Demyelinisierung eine Rolle spielen können wie u.a. das Proteolipidprotein, Myelin-Oligodentrozyten-Glykoprotein und Myelin-Oligodentrozyten-basisches Glykoprotein (Mix et al. 2010). Durch erneute Antigenpräsentation, z.B. durch Mikroglia, kommt es im ZNS zur Reaktivierung und zum Auslösen einer pathologischen Immunreaktion. Die Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor Necrosis Factor α und Interferon (IFN) γ führt zu einer chemokinvermittelten Rekrutierung von verschiedenen an der Immunreaktion beteiligten Zellen wie Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, die gemeinsam eine Demyelinisierung bewirken oder verstärken (Beck et al. 1988, Zamvil und Steinman 2003, Sospedra und Martin 2005). Verschiedene Mechanismen greifen dabei ineinander (Haines et al. 2011). CD8-positive T-Lymphozyten, welche in den Läsionen klonal expandieren, schädigen die Oligodentrozyten oder Axone direkt zytotoxisch. Anti-Myelin-Antikörper, Komplementfaktoren und myelintoxische Zytokine führen zu einer Schädigung von Myelinproteinen, welche dann durch Phagozytose von Makrophagen abgebaut werden. Durch Zerstörung der Markscheiden und Schädigung der Oligodendrozyten wird die saltatorische Erregungsfortleitung beeinträchtigt (Nave und

Trapp 2008). Außerdem fehlt die trophische Versorgung der Axone sowie der mechanische und chemische Schutz. Die Axone werden dadurch vulnerabel gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten und können ihr Membranpotential nicht stabilisieren, was zu Kalziumeinstrom, zum Anschwellen und letztendlich zur Diskonnektion des Axons führt (Smith 2007). Der Axonschaden korreliert eng mit der Entzündung, findet aber auch in anderen nicht entzündlich veränderten Hirnarealen statt. Axonale Schäden treten schon früh im Krankheitsverlauf auf und können mit reversiblen oder irreversiblen klinischen Funktionsausfällen einhergehen (Owens 2003). Mit fortschreitender Erkrankung nimmt die neuronale Plastizität ab und die Wahrscheinlichkeit steigt, dass Läsionen mit bleibender Funktionseinschränkung korrelieren (Wujek et al. 2002). Lange Zeit wurde angenommen, dass sich die Entzündungsreaktion auf die weiße Substanz des ZNS beschränkt. Neuere Studien lassen jedoch den Schluss zu, dass es ebenfalls zu in der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) nicht visualisierbaren kortikalen Läsionen sowie zu einer Schädigung tiefer Kerngebiete grauer Substanz kommt (Kutzelnigg et al. 2005). Das morphologische Korrelat der Immunreaktion sind Demyelinisierung und Axondegeneration sowie gliöse Narben. Nach dem Abklingen der akuten Entzündung sind die Schäden an den Myelinscheiden durch Remyelinisierung potentiell reversibel. Die Remyelinisierung konnte sowohl bei der schubförmigen als auch bei der chronisch progredienten Verlaufsform nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Remyelinisierung ist jedoch interindividuell sehr unterschiedlich ausgeprägt (Patrikios et al. 2006). Insgesamt besteht eine ausgeprägte Heterogenität der pathologischen Veränderungen, welche sich auch in der Heterogenität der klinischen Symptommanifestation widerspiegelt (Lassmann et al. 2007).

Bildmorphologisch manifestieren sich die Plaques als multifokale, scharf begrenzte Entmarkungsherde mit bevorzugtem Auftreten in der Umgebung kleiner Venolen. Diese Herde stellen aktive oder inaktive Läsionen dar, wobei in den inaktiven kein aktiver Myelinabbau stattfindet. Prädilektionsstellen sind die periventrikuläre weiße Substanz, der Nervus opticus, der Balken, der Hirnstamm, das Kleinhirn und das Rückenmark (Rovira und León 2008). Atypische Verteilungsmuster sind jedoch möglich (Filippi et al. 2012).

1.1.3 Verlauf, Diagnostik und Symptomatik

Klinisch manifestieren sich akute Entzündung und axonale Degeneration als akuter Krankheitsschub und schleichende Akkumulation irreversibler neurologischer Defizite, im

Sinne einer chronischen Progression.

Als Schub wird dabei ein neu aufgetretenes oder wieder aufgetretenes neurologisches Defizit definiert, das mehr als 24 Stunden andauert und mindestens 30 Tage nach dem letzten Schub auftritt (McDonald et al. 2001). Es darf nicht durch eine Erhöhung der Körpertemperatur, beispielsweise durch einen Infekt, erklärt werden können. Bei erhöhter Körperkerntemperatur liegen schlechtere Reizleitungsbedingungen vor. Symptome können sich bei Anstieg der Körpertemperatur, wie zum Beispiel bei Fieber, einem heißen Bad oder körperlicher Anstrengung, verstärken oder neu auftreten. Man spricht in diesem Fall von einem Pseudo-Schub oder einem Uhthoff-Phänomen (Guthrie und Nelson 1995).

Das Ausmaß der Funktionseinschränkung kann mittels EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) operationalisiert werden (Kurtzke 1983, Tabelle 1). Der EDSS ist ein international verwendeter Score, der den Grad der Behinderung und die damit verbundene Einschränkung durch die MS erfasst und das neurologische Defizit auf einer Skala von 0 bis 10 quantifiziert. Die Abstufung von 0 bis 10 umfasst den Zustand ohne jegliche Behinderung (0) bis hin zum Tod durch MS (10). Es werden dabei die acht Funktionssysteme, Pyramidenbahn, Sensorium, Kleinhirn, Blasen- und Mastdarm, Hirnstamm, Visus, Kognition und andere nach dem Grad ihrer Einschränkung bewertet (Kurtzke 1983). Als besonderer Schwerpunkt fließt die motorische Einschränkung, besonders die Gehfähigkeit, in den Wert ein.

Tabelle 1: **Expanded Disability Status Scale (EDSS)** (modifiziert nach Kurtzke 1983)

Der EDSS gibt den Behinderungsgrad durch die Multiple Sklerose unter Berücksichtigung der Anzahl und des Schweregrades der betroffenen Funktionssysteme auf einer Skala von 0,0 bis 10,0 an.

Grad	Beschreibung
0,0	Normale neurologische Untersuchung.
1,0	Keine Behinderung, minimale Abnormität in einem funktionellen System (FS).
1,5	Keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem FS.
2,0	Minimale Behinderung in einem FS.
2,5	Minimale Behinderung in zwei FS.
3,0	Mäßiggradige Behinderung in einem FS oder leichte Behinderung in drei bis vier FS, jedoch voll gehfähig.
3,5	Voll gehfähig, aber mit mäßiger Behinderung in einem FS (Grad 3) und leichte Behinderung in ein bis zwei FS (Grad 2), oder mäßiggradige Behinderung in zwei FS, oder leichte Behinderung in fünf FS.
4,0	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m. Aktiv während ca. 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung.
4,5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m. Ganztägig arbeitsfähig. Gewisse Einschränkung der Aktivität, benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung.
5,0	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen (z. B. ganztägig zu arbeiten ohne besondere Vorkehrungen).
5,5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m. Behinderung schwer genug, um normale tägliche Aktivität zu verunmöglichen.
6,0	Bedarf, intermittierend oder auf einer Seite konstant, der Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 100 m ohne Rast zu gehen.
6,5	Benötigt konstant beidseits Hilfsmittel (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 20 m ohne Rast zu gehen.
7,0	Unfähig, selbst mit Hilfe, mehr als 5 m zu gehen. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt den Rollstuhl selbst und transferiert ohne Hilfe.
7,5	Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für den Transfer. Bewegt den Rollstuhl selbst, aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen. Benötigt eventuell motorisierten Rollstuhl.
8,0	Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden. Pflegt sich weitgehend selbstständig. Meist guter Gebrauch der Arme.
8,5	Weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages. Einiger nützlicher Gebrauch der Arme, einige Selbstpflege möglich.
9,0	Hilfloser Patient im Bett. Kann essen und kommunizieren.
9,5	Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren.
10,0	Tod infolge von MS

Kognitive und vegetative Symptome werden durch den EDSS nur limitiert abgebildet. Ab einem EDSS von 4,0 ist die Motorik der unteren Extremität das dominante Kriterium für eine weitere Progression. Aufgrund der genannten Limitierungen wurden alternative Scores entwickelt wie der MSFC (*Multiple Sclerosis Functional Composite*), durch welchen insbesondere die kognitiven Fähigkeiten stärker repräsentiert werden sollen. Dabei fließen die drei funktionellen Systeme (FS) Armmotorik, Beinmotorik und Kognition in gleichem Ausmaß in den berechneten Wert ein. Dieser Score stellt eine Alternative zur Erfassung klinischer Einschränkungen dar (Rudick et al. 2002). Die Dokumentation des Krankheitsverlaufs via EDSS bleibt jedoch in der Klinik das am häufigsten verwendete Instrument zur Dokumentation von Funktionseinschränkungen durch die MS.

Der Verlauf der Erkrankung ist nicht vorhersagbar und von Patient zu Patient unterschiedlich. Klinisch können fünf verschiedene Stadien und Verlaufsformen mittels Krankheitsprogredienz sowie dem Auftreten von Schüben charakterisiert werden:

- Radiologisch-isoliertes Syndrom (*Radiologically Isolated Syndrome,* RIS)
- Klinisch-isoliertes Syndrom (*Clinically Isolated Syndrome,* CIS)
- Schubförmige MS (*Relapsing Remitting MS,* RRMS)
- Sekundär chronisch progrediente MS (*Secondary Progressive MS,* SPMS)
- Primär chronisch progrediente MS (*Primary Progressive MS,* PPMS)

Bei 80% der MS-Patienten beginnt die Erkrankung schubförmig. Dabei entwickeln sich die Schübe akut oder subakut. Nach einigen Tagen bis Wochen tritt eine Remission ein, die vollständig oder unvollständig sein kann. Bei ca. 30%-40% der Patienten mit zunächst schubförmigem Verlauf kommt es nach etwa zehn Jahren zum Übergang in eine chronisch-progrediente Verlaufsform (Weinshenker et al. 1989). Schübe können in dieser Phase noch „aufgesetzt“ vorkommen. In 10%-15% der Fälle treten die Symptome von Anfang an langsam progredient und ohne Remission auf. Man spricht in diesem Fall von einer primär chronisch progredienten MS (Thompson et al. 1997). Als CIS bezeichnet man das erstmalige Auftreten einer klinischen Symptomatik mit korrespondierendem Nachweis eines Demyelinisierungsherdes, welcher jedoch noch nicht die Kriterien der räumlichen und zeitlichen Dissemination für die Diagnose einer definitiven MS erfüllt. Finden sich bei

asymptomatischen Patienten MS-typische Befunde in der MRT, spricht man von einem RIS (Sellner et al. 2010). Die Übergänge zwischen den verschiedenen Verlaufsformen sind fließend und nicht immer ist eine eindeutige Zuordnung möglich (Flachenecker et al. 2008).

Zur Sicherung der Diagnose MS werden in der Gegenwart die McDonald-Kriterien angewandt, welche auf Anamnese, Bildgebung, paraklinischen Befunden und Liquordiagnostik basieren. Erstmals wurden diese Kriterien 2001 veröffentlicht (McDonald et al. 2001, Tabelle 2). Seitdem kam es zu breiter Anwendung und Weiterentwicklung angesichts neuer Forschungserkenntnisse. So erfolgten 2005 und 2010 Revisionen durch die Arbeitsgruppe um C.H. Polman mit dem Ziel, die Diagnosekriterien zu vereinfachen, um eine frühe Diagnosestellung zu erleichtern (Polman et al. 2005, Polman et al. 2011). Weiterhin bestehen aber Limitierungen bei den Diagnosekriterien (Tumani et al. 2011).

Tabelle 2: **Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose** (modifiziert nach McDonald et al. 2001)
Dabei werden die klinisch erhobenen Befunde durch paraklinische Befunde, insbesondere die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) gestützt.

Schübe	Objektivierbare klinische Manifestation	Weitere erforderliche Kriterien
2 oder mehr	2 oder mehr	Keine; klinische Evidenz ausreichend
2 oder mehr	1	Nachweis räumlicher Dissemination durch: MRT[1] **oder** 2 oder mehr MS-typische Läsionen im MRT und positiver Liquorbefund[2] **oder** weiterer klinischer Schub
1	2 oder mehr	Nachweis zeitlicher Dissemination durch: MRT[3] **oder** zweiter klinischer Schub
1 (mono-sympto-matisch)	1	Nachweis räumlicher Dissemination durch: MRT[1] **oder** 2 oder mehr MS-typische Läsionen im MRT mit positivem Liquorbefund **und** Nachweis zeitlicher Dissemination durch: MRT[3] **oder** zweiter klinischer Schub
0 (schleich-ende Progression seit Beginn)	-	Positiver Liquorbefund **und** Nachweis räumlicher Dissemination durch: > 8 T2-gewichtete Läsionen im cerebralen MRT **oder** > 1 Rückenmarksläsion **oder** 4-8 cerebrale Läsionen und eine Rückenmarksläsion **oder** positives VEP **und** 4-8 cerebralen Läsionen **oder** < 4 cerebrale Läsionen und eine Rückenmarksläsion **und** Nachweis zeitlicher Dissemination durch: MRT **oder** kontinuierliche Progression über 1 Jahr

[1] Nachweis räumlicher Dissemination durch drei der folgenden 4 Kriterien:
1. Eine Gadolinium (Gd)-anreichernde Läsion oder 9 T2-hyperintense Läsionen, falls keine Gd-anreichernde Läsion vorhanden ist. 2. Eine oder mehr infratentorielle Läsionen. 3. Eine oder mehr juxtakortikale Läsionen. 4. Drei oder mehr periventrikuläre Läsionen. Dabei kann eine spinale Läsion eine cerebrale Läsion ersetzen.

[2] Positiver Liquorbefund: Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor cerebrospinalis oder eines erhöhten IgG-Index.

[3] Nachweis zeitlicher Dissemination im MRT: Nachweis einer Gd-anreichernder Läsion mit neuer Lokalisation in einem MRT, das mindestens drei Monate nach dem Beginn eines klinischen Schubes aufgenommen wurde oder, wenn keine Gd-anreichernde Läsion nachzuweisen ist, Nachweis einer Gd-anreichernden Läsion oder einer neuen T2-Läsion in einem Verlaufs-MRT drei Monate später.

Ausschlaggebend für die Sicherung der Diagnose ist nach den McDonald-Kriterien der Nachweis einer örtlichen und zeitlichen Dissimination der Entmarkungsherde. Dabei kommen neben der ausführlichen Anamneseerhebung apparative diagnostische Verfahren wie die MRT und die Messung evozierter Potentiale (EP) zum Einsatz. Zum Nachweis des entzündlichen Charakters der MRT-Läsionen sowie zum Ausschluss anderer Entzündungen wie Lues und Borreliose ist die Liquorpunktion mit Bestimmung der oligoklonalen Banden (OKB) im Liquor cerebrospinalis unerlässlich. Diese durch isoelektrische Fokussierung nachweisbaren IgG-Banden (Immunglobulin G) sind bei 95% der MS-Patienten positiv (Link und Huang 2006). Es handelt sich dabei um Antikörper, die im Rahmen einer Entzündung im Gehirn gebildet worden sind und die im Liquor, nicht aber im Serum nachweisbar sind.

Eine besondere Bedeutung erlangt dabei die MRT-Untersuchung mit Kontrastmittel. Aktive Läsionen nehmen Gadolinium (Gd) auf und lassen sich so von inaktiven Läsionen unterscheiden. Dadurch ist inzwischen der Nachweis einer zeitlichen Dissimination möglich, auch wenn ein Patient erst einen sicher nachgewiesenen Schub hatte. Dies ist besonders bedeutsam, da es sich als vorteilhaft erwiesen hat, so früh wie möglich mit der Therapie zu beginnen (Jacobs et al. 2000, Comi et al. 2001, Kappos et al. 2009, Tintoré 2009).

Generell gilt, dass die gebotenen Symptome nicht durch eine andere Erkrankung besser zu erklären sein dürfen. Daher wird der Differentialdiagnostik eine wichtige Bedeutung beigemessen (Zettl und Tumani 2005, Tumani et al. 2011).

Je nach Lokalisation der Entzündungs- und Glioseherde können neurologische Ausfälle in jedem neurologischen Funktionssystem auftreten. Die Symptome bzw. Symptomkombinationen sind dadurch sehr vielgestaltig. Man nennt die MS deshalb auch die Krankheit mit den tausend Gesichtern. Zu den frühen Symptomen der MS zählen Sensibilitätsstörungen (43,1%), Paresen (37%) und Visuseinschränkungen durch die Retrobulbärneuritis (30,1%) (Stuke et al. 2009). Im späteren Krankheitsverlauf entsteht häufig ein spastisch-ataktisches Gangbild. Bei ca. 80% der Patienten treten im Krankheitsverlauf Blasen- und Darmstörungen auf, wie die Dranginkontinenz und Darmentleerungsstörungen (Tubaro et al. 2012). Außerdem kommt es zu Hirnstamm- und cerebellären Symptomen. Ein häufiges Symptom ist außerdem die Fatigue, eine

generalisierte abnorme Müdigkeit. Kognitive und psychische Veränderungen nehmen im Verlauf der Erkrankung zu (Jongen et al. 2012, Stuke et al. 2009).

1.1.4 Therapie

Trotz intensiver Forschung gibt es derzeit noch keine kausal wirkende Therapie der MS. Ziel der Behandlung ist es daher, den natürlichen Verlauf der Erkrankung positiv zu beeinflussen und die entzündliche Krankheitsaktivität zu reduzieren. Die hierfür verwendeten Medikamente werden „disease modifying drugs“ (DMD) genannt. Ihre Hauptziele sind die Reduktion der Entzündungsreaktion im akuten Schub mit Rückbildung der schubassoziierten Symptome, die Verminderung der Schubfrequenz sowie die Verhinderung oder Verzögerung der Krankheitsprogression und Stabilisierung der eingetretenen Defizite auf möglichst niedrigem Niveau. Sie wirken kausalorientiert über eine Modulation des Immunsystems (MSTCG 2008, DGN 2012).

Des Weiteren kommt der Behandlung von MS-bedingten Symptomen und Funktionseinschränkungen durch die symptomatische Therapie eine wichtige Bedeutung zu (Henze 2004, DGN 2012). Entsprechend den Erfordernissen, die sich aus der Symptommanifestation ergeben, dient hierbei ein multimodales Therapiekonzept aus Pharmakotherapie, Physio- und Ergotherapie, Neuropsychiologie, Psychotherapie und Hilfsmittelversorgung dazu, vorhandene Symptome zu lindern und sekundäre Schäden zu vermeiden.

Die dritte Säule der MS-Therapie stellt das bisher wenig erforschte Gebiet der Krankheitsbewältigung dar (Apel et al. 2006).

1.1.4.1 Kausalorientierte Therapie

Die kausalorientierte immunmodulierende Therapie wird eingeteilt in die Therapie im akuten Schub, die verlaufsmodifizierende Basistherapie und die Eskalationstherapie bei Versagen der Basistherapie (Abbildung 1).

Indikation	CIS	RRMS		SPMS		
Eskalations-therapie			1. Wahl Fingolimod Natalizumab	2. Wahl Mitoxantron (Cyclophosphamid)	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetze Schübe
Basistherapie	Glatirameracetat Interferon-β 1a i.m. Interferon-β 1a s.c. Interferon-β 1b s.c	Glatirameracetat Interferon-β 1a i.m. Interferon-β 1a s.c. Interferon-β 1b s.c (Azathioprin) IVIg			Interferon-β 1a s.c. Interferon-β 1b s.c Mitoxantron (Cyclophosphymid)	Mitoxantron (Cyclophosphamid)
Schub-therapie	2. Wahl	Plasmapherese				
	1. Wahl	Methylprednisolon				

Abbildung 1: **Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose** (modifiziert nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN 2012: Leitlinien der DGN – Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose [16.08.2012]).

i.m.: intramuskulär
s.c.: subkutan
CIS: clinically isolated syndrome
RRMS: relapsing remitting multiple sclerosis
SPMS: secondary progressive multiple sclerosis

Die Schubtherapie erfolgt nach einer strukturierten, neurologischen Untersuchung, dem Ausschluss von Differentialdiagnosen sowie von Kontraindikationen gegen die Anwendung von Glukokortikosteroiden. Unter Magenschutz und Thromboseprophylaxe werden 1 g Methylprednisolon einmal täglich über fünf Tage intravenös (i.v.) appliziert. Bei ausbleibendem Therapieerfolg kann die Therapie nach 14 Tagen in der Dosierung 2 g Methylprednisolon pro Tag wiederholt werden. Tritt auch hierunter keine Besserung der Symptome ein, steht als Reservetherapie die Plasmapherese zur Verfügung (Weinshenker et al. 1999).

Die Basistherapie mit DMD unterscheidet sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Verlaufsform. Zur Therapie des klinisch isolierten Syndroms und der schubförmigen MS stehen IFN-β 1a und IFN-β 1b sowie Glatirameracetat (GA) als Mittel der ersten Wahl zur Verfügung (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group 1993, Johnson et al. 1995, Jacobs et al. 1996, PRISM Study Group 1998, Jacobs et al. 2000, Comi et al. 2001, Comi et al. 2009, Kappos et al. 2009). Intravenöse Immunglobuline und Azathioprin werden derzeit als Therapeutikum der zweiten Wahl zur Therapie dieser Verlaufsformen angewandt. Im

Rahmen der Eskalationstherapie der schubförmigen MS bei Versagen der Basistherapie bzw. bei Patienten mit hochaktivem Verlauf kommen das orale Immuntherapeutikum Fingolimod (Kappos et al. 2010) und der monoklonale Antikörper Natalizumab (Polman et al. 2006) zum Einsatz. Als Mittel der zweiten Wahl steht das Zytostatikum Mitoxantron zur Verfügung.

Bei der Therapie der sekundär chronisch progredienten MS unterscheidet sich die Therapie je nach dem, ob noch „aufgesetzte“ Schübe vorkommen oder ob es sich um eine kontinuierliche Progression ohne „aufgesetzte“ Schübe handelt. Im Fall von aufgesetzten Schüben sind IFN-β 1a subcutan (s.c.) und 1b s.c. sowie Mitoxantron zur Therapie zugelassen (European Study Group on interferon beta 1b in secondary progressive MS 1998, Kappos et al. 2004). Fehlen diese, kommt nur noch Mitoxantron zum Einsatz. Als individueller Heilversuch kann die zyklische Glukokortikosteroidtherapie durchgeführt werden (DGN 2012).

Für die Therapie der primär chronisch progredienten MS haben klinische Studien keinen eindeutigen Nutzen durch die Therapie mit Immunmodulatoren (IFN-β, GA) zeigen können. Die in dreimonatigen Abständen durchgeführte Pulstherapie mit Glukokortikosteroide kann als individueller Heilversuch durchgeführt werden (MSTCG 2008, DGN 2012).

1.1.4.2 Disease modifying drugs

Im Folgenden werden die einzelnen Immunmodulatoren beschrieben, wobei der Schwerpunkt hier auf die für diese Arbeit relevanten Beta-Interferone gelegt wird.

1.1.4.2.1 Interferon-β

Interferon-β (IFN-β) ist ein natürlicherseits von Fibroblasten gebildetes Glykoprotein, bestehend aus 166 Aminosäuren. (Derynck et al. 1981). Es wirkt im Rahmen der körpereigenen Immunantwort antiviral, antiproliferativ und immunmodulierend (Jacobs und Johnson 1994). In der Therapie der MS wurde es anfangs in der Annahme, dass es sich bei der MS um eine Viruserkrankung handelt, aufgrund seiner antiviralen Eigenschaften eingesetzt. Dabei konnte ein positiver Effekt auf den natürlichen Krankheitsverlauf gezeigt werden. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht zur Gänze verstanden.

Folgende Annahmen werden postuliert:

Der Effekt des IFN-β auf das Immunsystem resultiert aus dem Einfluss auf T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke sowie aus der Modulation der Zytokinproduktion (Mendes und Sá 2011). IFN-β inhibiert die Antigenprozessierung und -präsentation durch verminderte Expression von major histocompatibility complex (MHC) Klasse II-Molekülen und verringert damit die Aktivierung von T-Lymphozyten. Außerdem wirkt es über die Apoptose autoreaktiver T-Lymphozyten und Induktion von regulatorischen T-Lymphozyten einer T-Zell-Proliferation und -Differenzierung entgegen. Über verschiedene Mechanismen erschwert IFN-β die Transmigration von Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke und damit das Einwandern von aktivierten Leukozyten in Entzündungsherde. Unter anderem vermindert es dabei die Expression von Adhäsionsmolekülen wie vascular cell adhesion molecule-1 und very late activation antigen-4 (Calabresi et al. 1997, Graber et al. 2005). In vitro Analysen haben außerdem eine Verringerung der Aktivität von Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) und die damit verbundene Verminderung der Leukozytenmigration ins Hirnparenchym gezeigt (Trojano et al. 1999). Darüber hinaus wird IFN-β eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben, welche die Remyelinisierung unterstützt (Dhib-Jalbut und Marks 2010).

Bei therapeutischem IFN-β werden zwei molekulare Formen unterschieden: IFN-β-1a und 1b. IFN-β 1a wird rekombinant aus Ovarzellen des chinesischen Hamsters hergestellt. Es wird intramuskulär (i.m.) in der Dosierung 30µg 1 x pro Woche (Avonex; Biogen Idec) oder s.c. in der Dosierung 3 x pro Woche 22 bzw. 44 µg (Rebif; Merck Serono) injiziert. IFN β-1b (Betaferon; Bayer Schering) wird aus prokaryoten Bakterienzellen gewonnen. Es ist im Gegensatz zu IFN β-1a und humanem IFN-β nicht glykosiliert, außerdem unterscheidet es sich von diesen in einer Aminosäure an Position 17 sowie durch das Fehlen der ersten Aminosäure Methionin. IFN β-1b wird alle zwei Tage s.c. in der Dosierung 250µg injiziert.

Zur Therapie der schubförmigen MS stehen damit drei Interferone zur Verfügung, deren Wirksamkeit in mehreren großen randomisierten, multizentrischen Doppelblind-Studien mit dem Evidenzgrad 1 bewiesen wurde (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group 1993, Jacobs et al. 1996, PRISM Study Group 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Schubfrequenz unter der Therapie mit IFN-β um mehr als 30% reduziert und die

Ausbildung einer sicheren MS nach dem ersten Schub hinausgezögert werden kann (Jacobs et al. 2000, Comi et al. 2001, Kappos et al. 2009). Außerdem wird die Krankheitsprogression, gemessen am EDSS, vermindert und damit der Grad der Behinderung durch MS reduziert. Die Anzahl der aktiven Gd-aufnehmenden Herde im MRT ist unter dieser Therapie ca. 30% geringer als in der Placebogruppe.

Im direkten Vergleich der Interferon-Präparate zeigten mehrere Studien hinsichtlich der Endpunkte Schubfrequenz und Dauer bis zum erneuten Schub sowie Krankheitsprogression und Anzahl neuer Demyelinisierungsherde im MRT keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Medikamenten (Koch-Henriksen et al. 2006, Patti et al. 2006, Masdeh et al. 2010). Eine leichte Überlegenheit der mehrmals pro Woche verabreichten Präparate gegenüber dem einmal pro Woche applizierten IFN-β 1a i.m., die von einigen Autoren postuliert wird (Durelli et al. 2002, Panitch et al. 2002), wird möglicherweise im Verlauf durch das häufigere Auftreten von neutralisierenden Antikörpern (*neutralizing Antibodies,* NAb) bei diesen Präparaten aufgehoben.

Bei den Nebenwirkungen der IFN-β-Therapie handelt es sich vor allem um Hautreaktionen an der Injektionsstelle, die bei bis zu 80% der Patienten auftreten (Panitch et al. 2002). Des Weiteren beklagen mehr als die Hälfte der Patienten grippeähnliche Symptome wie Fieber, Myalgien, Kopfschmerzen und Abgeschlagenheit. Durch die abendliche Injektion mit richtiger Injektionstechnik und die prophylaktische Gabe von nichtsteroidalen Antirheumatika prä-injektionem kann das Auftreten und das Ausmaß der Nebenwirkungen vermindert werden. Langzeitstudien bestätigten die insgesamt gute Verträglichkeit der Beta-Interferone. Auch nach einer längeren Therapiedauer konnten keine neuen schwerwiegenden Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Río et al. 2005 b).

Während der IFN-β-Therapie kann es außerdem zu Bildung von NAb gegen das Medikament kommen. Die NAb-Bildung ist bei IFN-β 1b mit 23-38% vergleichsweise hoch (IFNB MS Study Group 1996, European Study Group 1998, Rudick et al. 1998). Bei IFN-β 1a i.m. ist sie mit 3-6% am niedrigsten (Rudick et al. 1998, Durelli et al. 2002). Unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. variiert die Häufigkeit der Antikörperbildung je nachdem, ob die niedrigere Dosis von 22 µg oder die höhere Dosis von 44 µg verabreicht wurde zwischen 9,8 und 24% (PRISMS Study Group 2001, Freedman et al. 2005). Da es zur Wirkabschwächung kommen kann, sollte bei klinischem Verdacht auf ein

Therapieversagen eine Bestimmung der NAb und gegebenenfalls ein Therapiewechsel erfolgen (Tomassini et al. 2006, Polman et al. 2010, Killestein und Polman 2011).

Das individuelle Ansprechen auf die Therapie ist zwischen den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich. Bei ca. einem Drittel der mit IFN-β therapierten Patienten besteht trotz Therapie eine gleichbleibend hohe oder sogar verstärkte Schubaktivität (Waubant et al. 2003). Die Rate dieser sogenannten Nonresponder ist mit ca. 30% sehr hoch. Das Ansprechen auf die Therapie kann aber nur retrospektiv und frühestens nach sechs (Progression) bzw. zwölf (Schubrate) Monaten beurteilt werden. Außerdem gibt es derzeit keine international einheitlichen Richtlinien zur Klassifizierung von Respondern und Nonrespondern.

1.1.4.2.2 Glatirameracetat

Glatirameracetat ist ein Polypeptid-Gemisch, bestehend aus den vier Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin. Die Zusammensetzung ähnelt der des MBP, einem Bestandteil der Myelinscheide. Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass der Wirkstoff Immunzellen bindet, welche gegen Bestandteile der Myelinscheide gerichtet sind. Außerdem scheint es zu einer Verschiebung des Verhältnisses von TH1 Lymphozyten (T-Helfer Lymphozyten 1) zu TH2 Lymphozyten zu kommen. Durch die TH2 Lymphozyten werden vermehrt antiinflammatorische Zytokine freigesetzt. Darüber hinaus wird ein neuroprotektiver Effekt beschrieben (Aharoni et al. 2011). So wird postuliert, dass neurotrophe Faktoren wie der Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) vermehrt gebildet werden und dazu beitragen, die zerstörte Myelinschicht wieder aufzubauen (Ruggieri et al. 2007). GA wird täglich s.c. injiziert. In mehreren großen placebo-kontrollierten Studien konnte eine signifikante Reduktion der Schubrate und der Entzündungsaktivität im MRT nachgewiesen werden (Johnson et al. 1995, Comi et al. 2009). Vergleichende Studien mit IFN-β und GA ergaben keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Effizienz beider Medikamente (Mikol et al. 2008, O´Connor et al. 2009).

1.1.4.2.3 Medikamente der Eskalationstherapie

Seit 2006 ist mit Natalizumab ein monoklonaler Antikörper auf dem Markt. Er richtet sich gegen α4-Integrin und verhindert bzw. erschwert die Leukozytenmigration ins ZNS.

Dadurch bewirkt er eine verminderte Krankheitsaktivität und geringere Schubfrequenz. Natalizumab ist zur Therapie hochaktiver Verläufe der schubförmigen MS oder trotz Basistherapie rasch progredienter RRMS zugelassen. Gegen Placebo getestet zeigte sich sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombinationstherapie mit IFN-β 1a i.m. eine deutliche Reduktion der Schubaktivität (68%) und der EDSS-Progression (> 50%) (Polman et al. 2006, Pucci et al. 2011). Schwerwiegende Nebenwirkungen wie die gehäufte Manifestation der progressiven multifokalen Leukencephalopathie (PML) führten jedoch zu einer Limitierung der Zulassung auf oben genannte Indikationen (Bloomgren et al. 2012).

Ebenfalls zugelassen für hochaktive Verläufe schubförmiger MS sowie für trotz Basistherapie rasch progediente Verläufe von RRMS ist seit 2011 das Immunsuppressivum Fingolimod. Dabei handelt es sich um ein Sphingosin 1-Phosphat-Analogon, welches die Migration von Lymphozyten aus sekundärem lymphatischen Gewebe ins Blut vermindert (Garcia-Merino und Sanchez 2012). Dadurch wird auch die Rezirkulation von Lymphozyten ins Gehirn reduziert. Unter der Therapie konnte eine Reduktion der Schubrate und eine Verzögerung der Krankheitsprogression festgestellt werden (Kappos et al. 2010).

Bei Versagen der Basistherapie mit IFN-β oder GA sowie bei therapienaiven besonders rasch progredienten ungünstigen Verläufen kommt als Mittel der zweiten Wahl das Chemotherapeutikum Mitoxantron im Rahmen einer Eskalationstherapie zum Einsatz (Hartung et al. 2002). Es besteht ein dosisunabhängiges Leukämierisiko und ein dosisabhängiges Risiko für das Auftreten einer Kardiomyopathie, daher ist die Zulassung auf therapierefraktäre und ungünstige Verläufe der RRMS limitiert (DGN 2012). Es wird außerdem in der Therapie der sekundär chronisch progredienten MS verwendet.

Die Deeskalation der Therapie wird von einigen Patienten gewünscht und ist teilweise aufgrund von limitierenden Nebenwirkungen (NW) der Eskalationstherapeutika notwendig. Es gibt hierfür bisher jedoch keine klaren evidenzbasierten Strategien. Einige Szenarien wurden in kleinen Studien getestet (Havla et al. 2011, Rieckmann et al. 2012).

1.1.4.3 Symptomatische Therapie

Im Rahmen der symptomatischen Therapie werden Beschwerden behandelt, welche die

funktionellen Fähigkeiten und die Lebensqualität beeinträchtigen. Der Erhalt der Mobilität und die Teilhabe am beruflichen und gesellschaftlichen Leben sowie die Vermeidung von sekundären Krankheitskomplikationen haben dabei eine entscheidende Bedeutung. Die Behandlung erfolgt symptomorientiert und multimodal. Dabei kommen neben der Pharmakotherapie Physiotherapie, Ergotherapie, Psychotherapie und Rehabilitationsmaßnahmen zum Einsatz. Detaillierte Angaben zur symptomatischen Therapie finden sich in den Leitlinien für die symptomatische Therapie bei MS (Henze 2004, De Sa et al. 2011, DGN 2012).

1.1.4.4 Coping

Wegen des unklaren Verlaufs der MS sowie psychischer und physischer Einschränkungen der häufig sehr jungen Patienten ist die Krankheitsbewältigung oft schwierig. Depressionen und Suizid treten häufiger im Vergleich zur Normalbevölkerung auf (Sadovnik et al. 1996). Gründe hierfür sind neben Einsamkeit und fehlender sozialer Unterstützung auch das Fehlen von Mechanismen zur Krankheitsbewältigung. Hier sollten psychosoziale Hilfsangebote gemacht und aktive Copingstrategien gelehrt werden (Apel et al. 2006, Goretti et al. 2010).

1.2 Molekularbiologische Biomarker

Als Biomarker bezeichnet man einen objektivierbaren Messwert, der als Indikator für einen biologischen oder krankhaften Prozess im Körper dienen kann. Dabei kann es sich um Gene, Moleküle oder Zellen handeln oder auch um medizinische Phänomene wie das Auftreten von Krankheitssymptomen (Bielekova und Martin 2004).

Damit der Biomarker im klinischen Alltag Anwendung finden kann, sollte er idealerweise folgende Eigenschaften haben (Goertsches und Zettl 2007):

- hohe Sensitivität und Spezifität bzgl. der Ausprägung einer Krankheit oder des Effektes einer therapeutischen Intervention
- reproduzierbar, minimal-invasiv messbar und kostengünstig

Man kann verschiedene Biomarker unterteilen:

Diagnostische Biomarker geben Aufschluss darüber, ob eine bestimmte Krankheit besteht

oder nicht. In der Diagnostik der MS werden etwa als molekulare Biomarker die OKB im Liquor bestimmt. Sie unterstützen den Kliniker bei der Diagnosefindung und beim Ausschluss von Differentialdiagnosen.

Krankheitsaktivitätsmarker der MS stellen im klinischen Alltag der EDSS-Wert und die Schubfrequenz dar. Das Zytokin Osteopontin ist im Liquor von MS-Patienten erhöht und ein möglicher molekularer Indikator für die Krankheitsaktivität (Börnsen et al. 2011, Wen et al. 2012). Es ist bisher jedoch noch Gegenstand der Forschung und wird nicht routinemäßig bestimmt. Das gilt ebenso für das Chemokin CXCL13, welches mit erhöhter Krankheitsaktivität gemessen am EDSS, der Schubaktivität und der MRT-Aktivität assoziiert ist (Khademi et al. 2011).

Biomarker, die die Wirkung einer Therapie wiedergeben können, werden unterschieden in Marker der biologischen und Marker der klinischen Wirkung einer Therapie. Ein Beispiel für einen Biomarker der biologischen Wirkung von IFN-β ist MX1 (*Myxovirus resistance protein 1*), ein Protein mit antiviralen Eigenschaften, welches unter der Therapie mit IFN-β hochreguliert ist (Pachner et al. 2003, Hesse et al. 2009). Als Biomarker der klinischen Wirkung der IFN-β-Therapie gilt der Nachweis von NAb, welche im Verlauf gebildet werden können und dann mit einer verminderten Wirksamkeit der Therapie assoziiert sind (Killestein und Polman 2011).

Als prognostischer Biomarker gilt die Läsionslast im MRT in der frühen Phase der Therapie, welche mit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert ist (Killestein und Polman 2011). Ein prognostischer Biomarker, welcher die klinische Wirkung von IFN-β im Sinne eines Therapieansprechens oder -nichtansprechens vor Therapiebeginn vorhersagen kann, existiert im klinischen Alltag derzeit nicht und ist Gegenstand intensiver Forschung. In der Arbeit von Hecker et al. wurden 18 Studien analysiert, die vor Therapiebeginn im Blut gemessene Biomarker als prognostische Biomarker für den weiteren klinischen Verlauf der MS vorgeschlagen hatten. Die meisten der vorgeschlagenen molekularen Biomarker-Kandidaten konnten nicht in unabhängigen Studien bestätigt werden (Hecker et al. 2011).

Biomarker sind prinzipiell bestimmbar durch klinische Betrachtung und Auswertung von krankheitsspezifischen Symptomen und Ereignissen (EDSS, Schub) oder messbar durch Analysen von Gewebe oder Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin oder Liquor (Bielekova

und Martin 2004). Blut kann relativ minimal-invasiv und komplikationsarm durch periphere Venenpunktion gewonnen werden. Eine große Anzahl der bisherigen Studien zu molekularen Biomarkern wurde mit peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) durchgeführt (Goertsches et al. 2011). Zu den PBMC gehören vor allem Monozyten und Lymphozyten, welche eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen. Das verwendete Material kann wiederum auf verschiedenen Betrachtungsebenen untersucht werden. Die Blutzellen können beispielsweise auf Ebene der DNA (*desoxy-ribonucleic acid),* der RNA (*ribonucleic acid*), der Proteine oder der Metaboliten analysiert werden. Bei der hier vorliegenden Arbeit wurden die mRNA aus PBMC untersucht.

Auf Ebene des Trankriptoms besteht in der Gegenwart die Möglichkeit, die dynamischen Expressionsveränderungen aller Gene zu analysieren. Als Transkriptom bezeichnet man die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Gentranskripte, die in Form von RNA in einer Zelle oder Zellpopulation vorliegen (Zettl und Goertsches 2009). Verschiedene Methoden finden zur Erforschung des Transkriptoms Anwendung. Eine davon ist das RNA-Profiling. Darunter versteht man die Quantifizierung der Transkript-Mengen in einer Zellpopulation unter Verwendung der Mikrochip-Technologie.

1.3 Technologie und Anwendung von DNA-Mikroarrays

DNA-Mikroarrays erlauben die Untersuchung differentieller Genexpression unter Therapie. Die Mikrochips der Firma Affymetrix sind circa 1,6 cm² groß. Auf ihrer Oberfläche sind an definierten Positionen sogenannte Probes angebracht. Dabei handelt es sich um Gensonden aus synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, welche in Form von DNA vorliegen. Jedes Probe enthält in großer Anzahl 25-Basen-lange Oligonukleotide, welche spezifisch für ein ganz bestimmtes Gentranskript sind (Dalma-Weiszhausz et al. 2006). Trifft ein RNA-Fragment des untersuchten Probenmaterials auf ein komplementäres Oligonukleotid auf der Chip-Oberfläche, binden beide einander (Hybridisierung). Je mehr Transkripte eines Gens vorhanden sind, desto mehr RNA-Moleküle können an die entsprechende Sonde binden. Durch quantitative Messung der gebundenen RNA lässt sich erkennen, welche Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt wie stark exprimiert sind. Mit Hilfe eines Mikrochips können aus wenig Untersuchungsmaterial parallel alle Gene, für die eine Sonde auf dem Mikrochip existiert, in Hinblick auf ihr Expressionsniveau

bestimmt werden (DKFZ: Genomics and proteomics core facility – Affymetrix Technology [16.08.2012]).

Durch serielle Untersuchungen von Patienten unter einer spezifischen Therapie können die Genexpressionsmuster vor und unter Therapie in Hinblick auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten verglichen werden. Gene, deren Expression unter der Therapie verändert ist, werden durch das Medikament direkt oder indirekt reguliert. Dies erfolgt in der Regel indirekt über Beeinflussung von Signalwegen und Modulation der Aktivität von regulatorisch wirksamen Genen. Ein Nutzen eines solchen RNA-Profilings ist in dem Zugewinn an Informationen über diejenigen Gene zu sehen, die durch ein Medikament hoch- oder herunterreguliert werden (Zettl und Goertsches 2009). Mit zunehmendem Wissen über die hoch- und herunterregulierten Gene lassen sich Rückschlüsse auf die molekularen Wirkmechanismen ziehen, die dem klinischen Effekt des Medikaments, aber auch möglichen Nebenwirkungen zugrunde liegend.

Aktuell wird auf dem Gebiet der differentiellen Genexpression im Blut MS-kranker Patienten unter der IFN-β-Therapie intensiv geforscht (Goertsches et al. 2011). Von besonderem Interesse ist es, die mittels RNA-Profiling gewonnenen Expressionsdaten mit klinischen Daten, beispielsweise mit Informationen über den langfristigen Therapieerfolg zu vergleichen. Ein Ziel dabei ist, einen prognostischen Biomarker zu finden, beispielsweise ein Gen, welches schon in der Initialphase einer Therapie signifikant verändert ist und dessen initiale Expression Vorhersagen auf den zu erwartenden Erfolg der Therapie zulässt. Möglicherweise lässt auch erst die Kombination von Expressionsdaten verschiedener Gene eine solche Aussage zu.

Auf Basis von Genexpressions-Studien wurden bereits eine Vielzahl von Genen identifiziert, die unter der Therapie mit IFN-β bei MS-Patienten differentiell exprimiert sind (Goertsches et al. 2011, Paap et al. 2012). In einigen Fällen wird eine Korrelation mit einem bestimmten Ansprechen auf die Therapie postuliert (Wandinger et al. 2003, Stürzebecher et al. 2003). Bisher konnte jedoch keiner dieser möglichen prognostischen Biomarker im klinischen Alltag etabliert werden.

2 Fragestellung

IFN-β gehört zur weltweit etablierten immunmodulierenden Basistherapie der schubförmigen MS. Die molekularen Mechanismen, die für den therapeutischen Effekt der Therapie verantwortlich sind, sind bisher jedoch nur unvollständig verstanden.

Trotz der guten Wirksamkeit der IFN-β-Präparate in großen multizentrischen Studien kann das Ansprechen auf die jeweilige Therapie für den einzelnen Patienten nicht vorhergesagt werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist, das individuelle Ansprechen von zwölf MS-Patienten unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. zu evaluieren sowie durch Analyse der molekularen Veränderungen der Genexpression im Blut der einzelnen Patienten ein verbessertes Verständnis der molekularen Wirkungsweise des Medikaments zu erlangen. Hierzu wurden die Patienten vor Etablierung der Therapie sowie zu definierten Zeitpunkten unter der Therapie einerseits klinisch untersucht, andererseits wurde ihr Blut auf Transkriptom-Ebene analysiert (Abbildung 2).

Zur Auswertung des klinischen Verlaufs der Patienten sollten folgende Fragen untersucht werden:

- Wie ist die Adhärenzrate der Patienten über einen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren und was sind die Gründe für den Therapieabbruch?
- Wie gestaltet sich der Krankheitsverlauf der einzelnen Patienten unter der Therapie im Hinblick auf die klinischen Parameter Schubaktivität und EDSS-Progression?
- Bei welchen Patienten besteht trotz Therapie weiterhin eine deutliche Krankheitsaktivität und spiegelt sich diese in der cerebralen Bildgebung wider?
- Welche Nebenwirkungen treten auf?

Um einen tieferen Einblick in die molekulare Wirkung von IFN-β zu erhalten, sollten folgende molekularbiologischen Fragen untersucht werden:

- Welche Gene werden kurz- und langfristig unter der IFN-β-Therapie differentiell exprimiert?

- An welchen molekularen Funktionen und Prozessen sind diese Gene maßgeblich beteiligt?
- Für welche Transkriptionsfaktoren haben diese Gene Bindestellen in ihren Promotorregionen? Durch welche Faktoren wird die Transkription dieser Gene also maßgeblich reguliert?
- Spiegeln sich Unterschiede der Patienten in der Genexpression in klinischen Parametern wider?
- Lassen sich durch Analyse der Genfunktionen Rückschlüsse auf die durch IFN-β beeinflussten biologischen Mechanismen ziehen?

3 Patienten und Methoden

3.1 Studiendesign und -ablauf

In der prospektiven Längsschnittstudie wurden Patienten mit nach den McDonald-Kriterien von 2001 gesicherter schubförmiger MS über einen Zeitraum von fünf Jahren in der Universitätsklinik für Neurologie in Rostock beobachtet. Sie wurden nach den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) und der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) auf eine immunmodulatorische Behandlung mit IFN-β 1a s.c. dreimal wöchentlich eingestellt (Abbildung 2). Vor Initiierung der Therapie wurden klinische und paraklinische Parameter dokumentiert und als Zeitpunkt t0 (Baseline) festgehalten. Während des Beobachtungszeitraums wurden Folgeuntersuchungen durchgeführt und deren Ergebnisse mit denen der Baseline-Untersuchung verglichen. Hinsichtlich Veränderungen von Krankheitsprogression und Schub wurden die Patienten je nachdem ob sie einen stabilen Befund oder eine Befundverschlechterung zeigten zwei Gruppen zugeordnet: Responder und Nonresponder. Bei klinischer Indikation wurden zusätzlich optional MRT- und EP-Untersuchungen durchgeführt und ausgewertet.

Nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung der Patienten über Hintergründe und Ablauf der Studie erfolgten Blutabnahmen vor (t0, Baseline) und zwei Tage (t1), ein Monat (t2), ein Jahr (t3) und zwei Jahre (t4) nach Beginn der IFN-β 1a-Therapie. Aus diesen Blutproben wurden PBMC isoliert und auf Transkriptomebene mittels DNA-Mikrochips am Institut für Immunologie der Universität Rostock untersucht, um die kurzfristige und langfristige differentielle Genexpression unter Therapie im Vergleich zur Baseline-Expression zu analysieren (Abbildung 2).

Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Reg.-Nr. II HV 27/2003). Von allen Patienten wurde vorher das schriftliche Einverständnis zur Studienteilnahme eingeholt. Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

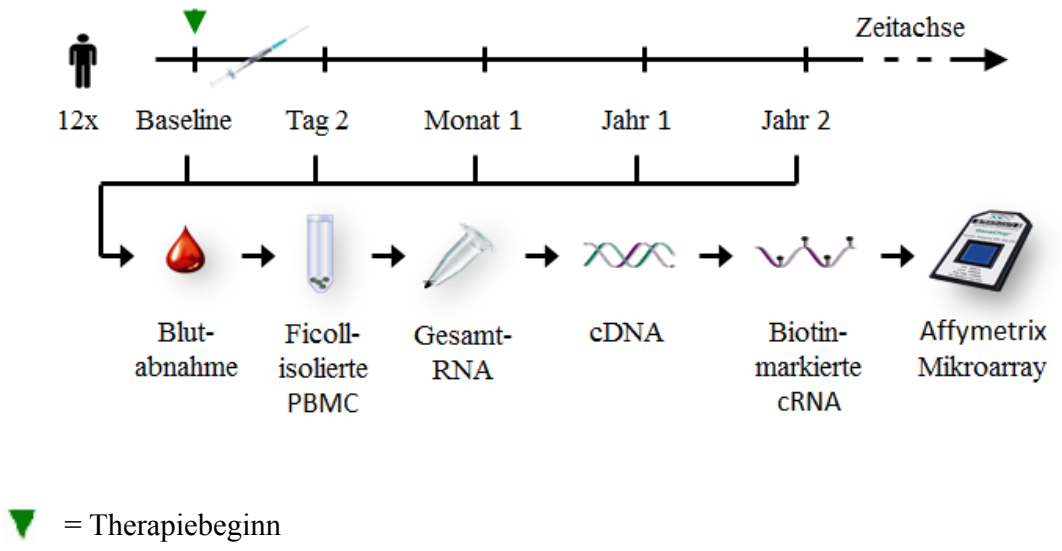


Abbildung 2: **Studiendesign**

Von zwölf MS-Patienten wurde vor Therapieinitiierung, zwei Tage nach der ersten Injektion sowie einen Monat, ein Jahr und zwei Jahre nach Therapiebeginn Blut entnommen. Mittels eines Ficoll-Gradienten wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) separiert. Aus diesen Zellen wurde die Gesamt-RNA extrahiert und auf Mikroarrays hybridisiert.

3.2 Patientenkollektiv

Es wurden zwölf kaukasische Patienten mit schubförmiger MS im Alter zwischen 18 und 52 Jahren im Zeitraum von Oktober 2001 bis September 2004 in die Studie eingeschlossen. Davon waren acht weiblichen und vier männlichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter betrug 36,4 Jahre (Spannweite (SW): 18 - 52, Standardabweichung (*Standard Deviation*, SD): 11,7). In zwei Fällen lag eine familiäre MS vor (Tabelle 3).

Tabelle 3: **Patientencharakteristika**

Patient	Geschlecht	Alter	KD	SyD	familiäre MS
1	w	40,6	33	1	0
2	w	52,4	1	6	1
3	w	35,8	25	2	0
4	w	19,6	2	0	0
5	m	48,2	2	6	0
6	w	18,1	1	4	0
7	w	43,8	8	2	0
8	w	43,3	5	9	0
9	m	26,0	1	4	0
10	m	25,6	5	2	0
11	w	48,7	0	1	1
12	m	34,5	4	6	0
Mittelwert		36,4	7,3	3,6	

Geschlecht: w: weiblich, m: männlich
familiäre MS: 0: nein, 1: ja
KD: Krankheitsdauer: Diagnosestellung bis Therapiebeginn in dieser Studie in Monaten
SyD: Symptomdauer: Erstes MS-assoziiertes Symptom bis Diagnosestellung in Jahren

Die Patienten waren bis auf zwei Ausnahmen therapienaiv, hatten also bisher keine immunmodulatorische Sekundärprophylaxe erhalten. Eine Patientin hatte eine Therapie mit IFN-β 1a s.c. zuvor wegen eines Kinderwunsches beendet und war bei Wiederaufnahme der Therapie nach 14 monatiger Pause in die Studie eingeschlossen worden. Eine weitere Patientin hatte zuvor während ihrer Schwangerschaft für sechs Monate Immunglobuline erhalten. Keiner der Patienten hatte in den 30 Tagen vor der ersten Blutabnahme Glukokortikosteroide oder ein anderes Immuntherapeutikum erhalten.

Die mittlere Dauer zwischen Diagnosesicherung und Therapiebeginn (Krankheitsdauer) in der vorliegenden Studie betrug 7,3 Monate (SW: 0-33, SD: 10,6). Im Durchschnitt lagen zwischen dem ersten MS-assoziierten Symptom und der Diagnosestellung (Symptomdauer) 3,6 Jahre (SW: 0-9, SD: 2,7). Die Patienten hatten vor Therapiebeginn im Durchschnitt einen EDSS von 2,3 Punkten (SW: 0,0-5,0, SD: 1,4).

3.3 Klinische Untersuchungen

3.3.1 EDSS und Schubaktivität

Die Krankheitsaktivität wurde klinisch durch die Parameter Schubaktivität und Krankheitsprogression, operationalisiert mittels EDSS, erfasst.

Die Schübe wurden wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben definiert und die Häufigkeit dokumentiert. Responder waren Patienten ohne neues Schubereignis ab dem siebten Therapiemonat. Nach der sechsmonatigen Initialphase nach Therapiebeginn galt das Auftreten eines Schubes als Nonresponse.

Die Krankheitsprogression wurde durch Auswerten der Veränderungen des im schubfreien Intervall erhobenen EDSS ermittelt. Die Werte der Folgeuntersuchungen wurden mit dem Baseline-EDSS (zum Zeitpunkt t0) verglichen. Eine über drei Monate persistierende Erhöhung um 1,0 Punkte wurde als ein unzureichendes Ansprechen auf die Therapie, ein gleichbleibender EDSS oder eine Verbesserung entsprechend als Therapieansprechen gewertet.

Aus den beiden Parametern Schub und Progression wurde ein Krankheitsaktivitätsscore ermittelt, der diese Parameter miteinander kombiniert. Hierbei wurden ebenfalls zwei Gruppen gebildet und eine Einteilung in Responder und Nonresponder vorgenommen. Ein Responder war dabei nur, wer sowohl in der Kategorie Schub als auch in der Kategorie Progression als Responder gewertet wurde. Ein Nonresponder war somit ein Patient, der entweder nach Progression oder Schubrate ein Nonresponder war.

3.3.2 Paraklinik

Die paraklinische Krankheitsaktivität konnte mittels der MRT-Untersuchung und der Messung der EP (VEP, SSEP, MEP) ausgewertet werden. Die Untersuchungen erfolgten bei klinischer Indikation.

<u>MRT</u>

Die Durchführung der cerebralen MRT erfolgte an Geräten der Stärke 1,5 Tesla im stationären und ambulanten Bereich. Die Schichtdicke betrug dabei 5 mm. Es wurden folgende Parameter bewertet:

- Anzahl der T2-Läsionen
- Anzahl der Kontrastmittel (KM) –aufnehmenden Herde (T1-gewichtet)
- Anzahl der Black holes (T1-gewichtet)
- Atrophie anhand des Durchmessers des III. Ventrikels

Zur Auswertung bildmorphologischer Veränderungen im Krankheitsverlauf unter der Therapie wurde das Baseline-MRT mit einem weiteren, späteren MRT verglichen. Die Zunahme eines der Unterpunkte (mindestens eine neue T2-Läsion, Auftreten von neuen KM-aufnehmenden Herden oder Black holes, Zunahme des Vetrikeldurchmessers um mindestens 1,5 mm gegenüber dem Ausgangswert) unter Therapie zeigte eine vorhandene Krankheitsaktivität an. Die beiden Gruppen, „stabiler Befund“ und „bildmorphologische Krankheitsaktivität“, wurden unterschieden.

EP

Des Weiteren wurden die folgenden EP untersucht: Visuell evozierte Potentiale (VEP), somatosensibel evozierte Potentiale (SSEP) und motorisch evozierte Potentiale (MEP).

Die Auswertung der VEP erfolgte anhand der Latenz der P100-Welle. Typischerweise zeigt sich bei Affektion des Nervus Opticus durch die MS eine verlängerte Latenz bei erhaltener Konfiguration und Amplitude der Ableitung (McDonald 2001). Die SSEP wurden unterteilt in Messungen der oberen Extremität (OE) (Potentiale des Nervus Medianus durch Messung der N20) und der unteren Extremität (UE) (Potentiale des Nervus Tibialis durch Messung der P40). Die MEP wurden am Musculus Interosseus dorsalis I und am Musculus Tibialis anterior gemessen. Als pathologisch galt eine Latenzverzögerung oder Amplitudenreduktion gegenüber den patientenspezifischen Normwerten des elektrophysiologischen Labors der neurologischen Universitätsklinik Rostock. Eine pathologische Zunahme der Latenz bzw. Abnahme der Amplitude um 10% des Ausgangswertes wurde als Verschlechterung der jeweiligen EP-Befunde und als paraklinische Krankheitsaktivität gewertet.

3.3.3 Nebenwirkungen der Interferon-β-Therapie

Bei jedem Klinikaufenthalt und jeder ambulanten Vorstellung wurden die Nebenwirkungen (NW) dokumentiert und in 3 Gruppen (A-C) eingeteilt.

In die Gruppe A wurden Hauterscheinungen an der Injektionsstelle eingeordnet.

In der Gruppe B wurden grippeähnliche Symptome subsummiert.

Gruppe C fasst andere NW, wie eine Erhöhung der Transaminasen oder die Ausbildung von NAb, zusammen.

Die Untersuchung der NAb beruhte auf dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) und auf dem MX1-Assay (Vallittu et al. 2008). Die Messung erfolgte bei klinischer Indikation an der medizinischen Hochschule Hannover.

3.4 Molekulare Untersuchungen

3.4.1 Blutprozessierung und Mikroarray-Analysen

Die Blutabnahmen erfolgten unmittelbar vor der ersten Interferonapplikation und in den Folgeuntersuchungen vor Medikamentenapplikation durch periphere Venenpunktion. Es wurden 20 ml Blut in EDTA-Röhrchen (Ethylendiamintetra-essigsäure) entnommen. Das Blut wurde stets innerhalb von zwei Stunden prozessiert.

Aus den Blutproben wurden die PBMC mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten separiert. Mittels RNeasy (Qiagen) wurde die gesamte RNA gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit einem Nanodrop 1000 Spectrophotometer. Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels Ethidiumbromid-Agarosegel-Elektrophorese. Da komplementäre DNA (cDNA) haltbarer als RNA ist, wurde die RNA zunächst mit Hilfe einer reversen Transkription zu cDNA zur Lagerung umgeschrieben.

Vor der Verwendung in weiteren Arbeitsschritten wurde die cDNA wieder in cRNA (*complementary RNA*) umgeschrieben und mit Biotin markiert. Die cRNA wurde dann in viele kurze Fragmente, bestehend aus 30 bis 400 Basen, zerteilt.

Diese markierten cRNA-Fragmente wurden dem Protokoll des Herstellers entsprechend auf HG-U133 Plus 2.0 Oligonukleotid-Mikrochips der Firma Affymetrix aufgebracht. Auf ihrer Oberfläche befinden sich ca. 1 Mio unterschiedliche Probes. Nach Aufbringen der RNA erfolgte die Hybridisierung der RNA-Fragmente an die komplementären Gensonden (Probes).

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die nicht-gebundene RNA abgewaschen und die zu-

rückgebliebene, gebundene RNA mit einem fluoreszierenden Biotin-bindenden Molekül inkubiert. Daraufhin wurde jeder Mikrochip mit einem Laser mit einer Auflösung von 1,56 µm gescannt. Hierzu wurde der Hewlett Packard GeneArray-Scanner 2500A der Firma Affymetrix verwendet. Anhand des Fluoreszenzmusters konnte nun das Ausmaß der Expression der einzelnen Gene quantifiziert werden. Je stärker das Fluoreszieren ist, desto mehr RNA-Moleküle wurden gebunden. Die 60 Mikrochips wurden im Zeitraum vom 20. bis zum 30.03.2007 gescannt.

3.4.2 Datenvorverarbeitung

Um aus den Rohdaten (die Fluoreszenzsignale der einzelnen Sonden auf dem Chip) Genexpressionswerte zu berechnen, wurde der MAS5.0-Algorithmus verwendet. Der Algorithmus benötigt die Information, welches Gen durch welches Probeset repräsentiert wird und wo sich die Probes zu diesem Probeset auf dem Chip befinden. Nach der originalen Chipdefinition von Affymetrix gibt es teilweise für ein Gentranskript mehrere Probesets. Ebenso binden einige Probes an mehrere Gentranskripte. Dadurch sind Spezifität und Sensitivität der Probesets in einigen Fällen nicht optimal. Daher wurde anstatt der originalen Chipdefinition von Affymetrix ein custom chip definition file (CDF) der Datenbank GeneAnnot in der Version 2.1.0 verwendet (Ferrari et al. 2007). Diese Chipdefinition definiert Probesets neu und zwar so, dass jeweils ein Probeset sämtliche Probes enthält, die nach heutiger Genannotation spezifisch für genau ein bestimmtes Gentranskript sind. Die Bestimmung der Transkriptionslevel ist dadurch genauer und man erhält für jeweils ein Gentranskript genau ein Expressionssignal. Es wurden pro Mikroarray insgesamt 18862 verschiedene Transkripte gemessen. Die Daten über die Signalintensität wurden für die zwölf Patienten zu jeweils fünf Zeitpunkten erfasst. Die Rohdaten wurden gemäß dem MIAME-Standard (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) gespeichert (Brazma et al. 2001) und sind abrufbar von der Datenbank Gene Expression Omnibus unter der Zugangsnummer GSE33464 (Gene Expression Omnibus-Datenbank (GEO) [16.08.2012]). Die Datennormalisierung erfolgte mittels einer loess-Normalisierung.

3.4.3 Expressionsveränderungen und Clustering

Um diejenigen Gene zu identifizieren, die besonders stark unter der Therapie in ihrer

Expression verändert sind, also um hoch- und herunterregulierte Gene herauszufiltern, wurden die Genexpressionslevel zum Zeitpunkt der Baselineuntersuchung mit jeweils einem weiteren Zeitpunkt unter der Therapie verglichen. Ein übliches Filterkriterium ist der fold change. Darunter versteht man den Quotienten aus der für jedes Gen jeweils gemessenen Signalintensität zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Er gibt Aufschluss über das Ausmaß der Signalveränderung unter der Therapie. Nachteil des fold change ist, dass die relativen Abweichungen mit abnehmender Signalintensität zunehmen, da Messungenauigkeiten einen größeren relativen Einfluss auf niedrig exprimierte Gene haben (Yang et al. 2002). Als Filterkriterium wurde daher der MAID-Score, ein von der Signalintensität abhängiger fold change, verwendet (Hecker et al. 2009). Pro Zeitpunktvergleich wurde für jedes Gen und jeden Patienten ein MAID-Score berechnet. Ein positiver MAID-Score entspricht einer Hochregulation, ein negativer MAID-Score entspricht einer Herunterregulation. Gene, die für mindestens sechs der zwölf Patienten einen MAID-Score > 2,5 oder < -2,5 hatten, wurden letztendlich gefiltert. Die Gene, die die Filterkriterien erfüllten, flossen in die weiteren Funktions- und Interaktionsanalysen ein.

Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs ihrer Expression wurden die gefilterten Gene mittels einer hierarchischen Clusteranalyse gruppiert. Die Cluster bestehen dabei aus Genen, deren Expression unter der Therapie eine im zeitlichen Verlauf ähnliche Veränderung aufweist. Für die Clusteranalyse wurden die Daten der Expressionslevel jedes Gens vorher standardisiert, so dass für jedes Gen eine Varianz von 1 und ein Mittelwert von 0 bestand. Die Clusteranalyse beruhte auf euklidischen Distanzen und dem complete linkage Verfahren.

In den untersuchten PBMC befinden sich verschiedene Lymphozytenfraktionen und Monozyten. Um festzustellen, von welchen einzelnen Zelltypen die gefilterten Gene exprimiert werden, wurde der Datensatz Haematlas (Watkins et al. 2009) verwendet, welcher in der Datenbank ArrayExpress verfügbar ist (ArrayExpress: Datenbank des European Bioinformatics Institute (Datensatz: E-TABM-633) [16.08.2012]). Dabei handelt es sich um Genexpressionsdaten gesunder Probanden zu verschiedenen Zell-Subpopulationen des Blutes. Es wurden die prozessierten Daten heruntergeladen und Mittelwerte der Signalintensitäten jedes einzelnen Gens über die Replikatemessungen für die verschiedenen Zelltypen berechnet. Lag dieser Mittelwert über einer Signalintensität

von 400, wurde geschlussfolgert, dass das Gen von dem jeweiligen Zelltyp exprimiert wird. Diese Signalintensität wurde willkürlich gewählt.

3.4.4 Funktionelle Gruppen

Des Weiteren wurden die Funktionen der gefilterten Gene untersucht. Unter Verwendung der Datenbanken SABiosciences und KEGG pathways (SABiosciences: a QIAGEN company. Complete list of SABiosciences Pathway-focused Arrays. [16.08.2012], KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [16.08.2012]) wurden die Gene funktionellen Kategorien zugeordnet. Diese Datenbanken definieren Gengruppen, indem sie Gene beispielsweise einer bestimmten Funktion, einer zellulären Lokalisation, einem molekularen Prozess oder einem Signalweg zuordnet. Die KEGG-Annotationen wurden dabei dem Bioconductor Paket org.HS.eg.db entnommen. Daraufhin wurden Genfunktionen ermittelt, die charakteristisch für die gefilterten Gene sind. Mit Hilfe des Softwareprogramms GOstats (Falcon und Gentleman 2007) wurde die Häufigkeit jeder funktionellen Gruppe unter den gefilterten Genen (*count*) erfasst und mit der Häufigkeit unter allen exprimierten Genen (*expected count*) verglichen. Als solche wurden Gene angesehen, die in mindestens einer der 60 Patientenproben eine Signalintensität von über 100 aufwiesen. Wenn der „count“ größer als der „expected count“ ist, bedeutet dies eine Überrepräsentation der Genfunktion unter den gefilterten Genen. Aus dem Verhältnis von „count“ und „expected count“ konnte ein p-Wert berechnet werden. Es wurden nur funktionelle Kategorien mit einem p-Wert <0,001 erfasst, zu denen sich mindestens fünf der gefilterten Gene zuordnen ließen. Diese Analyse ergab, welche Genfunktionen überrepräsentiert und typisch für die unter der Therapie veränderten Gene sind.

3.4.5 Analyse der beteiligten Transkriptionsfaktoren

Um die regulatorischen Einflüsse auf die gefilterten Gene näher zu beleuchten und die genregulatorischen Interaktionen als Netzwerk zu visualisieren, wurden nach Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS) in den Promotorregionen der Gene gesucht. Es wurden drei Datenbanken genutzt, die auf Basis von Positions-Gewichts-Matrizen (*Position-Weight-Matrix,* PWM) TFBS im Genom vorhersagen: UCSC tfbsConsSites, cisRED Human 9 und SwissRegulon (UCSC Genome Browser [16.08.2012], cisRED: cis-regulatory element database [16.08.2012], SwissRegulon [16.08.2012], Robertson et al.

2006, Pachkov et al. 2007, Dreszer et al. 2012). Es wurde mit dem gleichen statistischen Verfahren wie bei der Funktionsanalyse berechnet, welche TFBS in den Regulationsregionen der gefilterten Gene im Vergleich zu allen exprimierten Genen überrepräsentiert sind. Die Regulationsregionen wurden definiert als je 1000 Basenpaare ober- und unterhalb des Transkriptionsstarts der jeweiligen Gene. TFBS mit einem p-Wert <0,001 wurden als signifikant häufiger vorkommend bewertet. Diese Analyse ergab somit, welche TF maßgeblich an der Regulation der unter Therapie regulierten Gene beteiligt sind.

In einer graphischen Darstellung wurden die Interaktionen zwischen den entsprechenden Trankriptionsfaktoren und den durch sie regulierten Genen veranschaulicht. Als solche wurden Gene gewertet, die eine oder mehrere dieser Bindestellen in ihrer Regulationsregion aufwiesen. Die Interaktionen wurden mit der Software Cytoscape 2.8.0 visualisiert (Cytoscape: An Open Source Platform for Complex Network Analysis and Visualization [16.08.2012], Smoot et al. 2011).

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Von den zwölf in die Studie eingeschlossenen Patienten konnten elf über einen Zeitraum von 60 Monaten begleitet und in regelmäßigen Abständen untersucht werden. Ein Patient verließ die Studie vorzeitig im fünften Jahr (Patient (Pat) 09). Sieben Patienten erhielten das Medikament über den gesamten Studienzeitraum. Die restlichen fünf Patienten beendeten die Therapie vorzeitig, zwei davon bereits im zweiten Jahr und damit vor der letzten Blutentnahme (Pat 07 und 09). Die Gründe hierfür waren je in einem Fall Kinderwunsch (Pat 04), der Übergang in eine sekundär chronisch progrediente Verlaufsform (Pat 05), der Nachweis von NAb (Pat 08), Nebenwirkungen (Erhöhung der Leberfermente) (07) und Noncompliance (Pat 09). Pat 07 und 04 erhielten im Anschluss an die IFN-β Therapie Immunglobuline. Pat 04 wurde auf Glatirameracetat umgestellt. Die Eskalationstherapie bei Pat 05 erfolgte mit Mitoxantron. Pat 09 entschied sich gegen eine weitere immunmodulatorische Therapie. Bei Therapiebeginn wurden neun Patienten auf die niedrigere Dosis 22 µg IFN-β 1a s.c. eingestellt (Pat 01, 02, 04, 05, 07, 08, 09, 11, 12) und drei auf 44 µg (Pat 03, 06, 07). Bei sechs der Patienten, die zu Beginn die niedrige Dosis erhalten hatten, wurde die Dosis im Verlauf bei guter Verträglichkeit erhöht (Pat 01, 02, 05, 08, 11 12). NAb wurden nur in zwei Fällen aufgrund des Verdachts auf Therapieversagen bestimmt und waren in einem Fall positiv (Pat 08) und im zweiten Fall negativ (Pat 11). Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen betrug 1:2, passend zu den Beobachtungen, dass Frauen von der schubförmigen Verlaufsform häufiger als Männer betroffen sind (Greer und McCombe 2011).

4.2 Klinische Beobachtungen unter der Interferon-β-Therapie

4.2.1 EDSS

Der EDSS bei Baseline betrug 2,3 ± 1,4 (Mittelwert ± SD, SW: 0 – 5). Im Verlauf von zwei Jahren erhöhte sich der Wert auf 3,1 ± 1,9. Für die elf Patienten, welche über den gesamten Zeitraum von 60 Monaten an der Studie teilnahmen, stieg der Mittelwert nach dieser Zeit auf 3,7 ± 1,9 (Tabelle 4). Nach der oben beschriebenen Definition (Kapitel 3.3.1) für Response und Nonresponse waren nach 24 Monaten bezüglich des Kriteriums Progression von den zehn Patienten, welche das Medikament weiterhin erhielten, fünf Responder und fünf Nonresponder. Nach 60 Monaten verblieben sieben Patienten unter Therapie mit IFN-β 1a s.c., davon waren drei Patienten Responder und vier Nonresponder. Bei näherer Betrachtung verschärft sich das Ergebnis jedoch zugunsten der Nonresponder. Drei der fünf Patienten, die das Medikament vorzeitig abgesetzt hatten und die hier keiner Gruppe zugeordnet wurden, erfüllten bereits vor Absetzen der IFN-β-Therapie die Kriterien eines Nonresponders.

Tabelle 4: **EDSS-Werte der zwölf Patienten im langfristigen Verlauf der Therapie**

Die EDSS-Bestimmung erfolgte jeweils nach einem, zwei, drei, vier und fünf Jahren. Die Werte wurden jeweils mit dem Baseline-EDSS verglichen. Dargestellt ist außerdem, welche Patienten die Therapie mit Interferon-β 1a während des Studienzeitraums vorzeitig absetzten.

	EDSS (in Monaten)					
Patient	Baseline	12	24	36	48	60
1	3	2,5	3	3	3	3,5
2	2,5	2,5	4	4	4	4,5
3	3	2	3	3	3,5	4
4	0	0	0	0	0	0[1]
5	3,5	4	6	6	6	5,5[2]
6	0	0	1	0	0	0
7	2,5	4,5	5,5[3]	5,5	5,5	5,5
8	2,5	4	4	4,5	5[4]	5
9	1	1	1[5]	1	2	
10	1,5	3	4	4	4	4
11	2,5	1,5	1,5	1,5	4	4,5
12	5	4	4,5	4	4	4
Mittelwert	2,3	2,4	3,1	3,0	3,4	3,7
SD	1,4	1,6	1,9	2,0	1,9	1,9

[1] IFN-β 1a abgesetzt aufgrund von Kinderwunsch
[2] IFN-β1a abgesetzt aufgrund von Übergang in eine sekundär chronisch progrediente Verlaufsform
[3] IFN-β 1a abgesetzt aufgrund von Nebenwirkungen (Leberfermenterhöhung)
[4] IFN-β 1a abgesetzt nach Nachweis neutralisierender Antikörper
[5] IFN-β 1a eigenständig abgesetzt (Noncompliance)

SD: Standardabweichung
Baseline: Zeitpunkt t0 vor Therapiebeginn
Blau: Patient nicht mehr unter Therapie mit IFN-β 1a s.c.

4.2.2 Schubaktivität unter der Therapie

In den ersten sechs Monaten nach Therapiebeginn hatten drei von zwölf Patienten einen Schub, welcher gemäß der hier verwendeten Kriterien (Kapitel 3.3.1) nicht in die Bewertung zur Response mit einbezogen wurde.

Innerhalb des siebten bis 24. Monats kam es bei den zehn Patienten, die sich über den

Zeitraum von zwei Jahren unter Therapie befanden zu durchschnittlich 1,1 Schüben (SD: 1,0, SW: 0-3). Drei der zehn Patienten blieben über diesen Zeitraum schubfrei. Hinsichtlich des Kriteriums „Schub“ waren von den zehn Patienten unter Therapie nach 24 Monaten demzufolge drei Responder und sieben Nonresponder. Über den gesamten Studienzeitraum von 60 Monaten berechnet, kam es bei den sieben unter Therapie verbliebenen Patienten mit Ausnahme von Pat 03 zu Schüben, im Durchschnitt zu 2,7 Schüben (SD: 2,1, SW 0-6) (Tabelle 5).

Tabelle 5: **Aufgetretene Schübe im Studienverlauf von 60 Monaten**

Die Tabelle gibt die Anzahl der Schübe pro Zeiteinheit und pro Patient an. Die blau-unterlegten Felder bezeichnen den Zeitraum, in dem die jeweiligen Patienten bereits nicht mehr unter Therapie mit IFN-β waren.

	Schubmanifestation (in Monat)					
Patient	1 – 6	7 – 12	13 – 24	25 – 36	37 – 48	49 – 60
1	0	0	1	1	0	1
2	0	1	1	0	1	1
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	1
5	1	1	1	2	1	0
6	0	0	3	0	1	2
7	0	0	1	0	0	0
8	0	1	0	0	1	1
9	0	0	0	0	1	
10	0	0	0	0	1	0
11	1	0	1	0	0	0
12	1	1	0	2	1	0
Mittelwert	0,3	0,3	0,7	0,4	0,6	0,5

Blau: Patient nicht mehr unter Therapie mit IFN-β 1a s.c.

4.2.3 Krankheitsaktivitätsscore

Der Krankheitsaktivitätsscore setzt sich aus den Parametern Krankheitsprogression und Schub zusammen. Responder nach dem Krankheitsaktivitätsscore war nur, wer in diesen beiden Kategorien Responder war. Nach 24 Monaten hatten zwei Patienten die Therapie mit IFN-β 1a s.c. abgesetzt. Von den verbleibenden zehn Patienten waren nach oben genannter Definition zwei Patienten Responder. Acht Patienten waren als Nonresponder zu bewerten. Nach 60 Monaten wurde bei allen Patienten, bei denen die Therapie weitergeführt wurde, Krankheitsaktivität in Sinne eines Schubes oder einer EDSS-Progression festgestellt. Alle Patienten, die das Medikament vorzeitig abgesetzt hatten waren ebenfalls Nonresponder. Nach 24 Monaten waren von den zehn Patienten nach dem Kriterium „EDSS-Progression“ fünf Patienten als Responder einzustufen und nach dem Kriterium Schub drei Patienten. Dabei waren nur zwei Patienten nach beiden Kriterien Responder (Pat 03, 04, Tabelle 6).

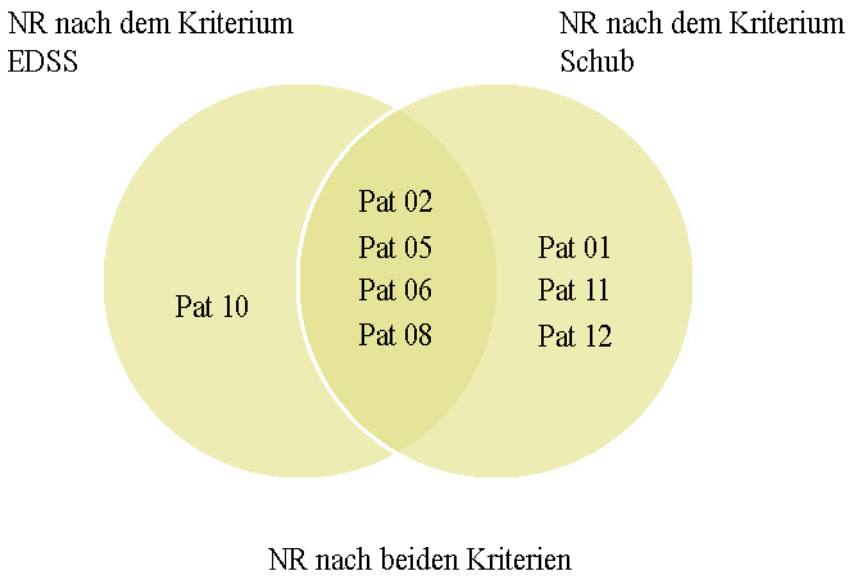
Tabelle 6: **Krankheitsaktivitätsscore**

Aus den Parametern Schub und EDSS-Progression wurden ein Score gebildet. Nach diesem Score war ein Patient nur dann als Responder einzustufen, wenn er sowohl im Kriterium EDSS-Progression als auch im Kriterium Schub ein Responder war. Der Tabelle ist zu entnehmen, welche Patienten nach diesen Kriterien zur Gruppe der Responder (R) und welche zur Gruppe der Nonresponder (NR) gehörten. Blau unterlegt ist hier ebenfalls der Zeitraum, in dem die Patienten nicht mehr unter Therapie waren.

	Krankheitsaktivitätsscore (nach Monaten)				
Patient	12	24	36	48	60
1	R	NR	NR	NR	NR
2	NR	NR	NR	NR	NR
3	R	R	R	R	NR
4	R	R	R	R	NR
5	NR	NR	NR	NR	NR
6	R	NR	NR	NR	NR
7	NR	NR	NR	NR	NR
8	NR	NR	NR	NR	NR
9	R	R	R	NR	
10	NR	NR	NR	NR	NR
11	R	NR	NR	NR	NR
12	NR	NR	NR	NR	NR

Blau: Patient nicht mehr unter Therapie mit IFN-β 1a s.c.

Eine Schubaktivität ohne persistierendes Defizit konnte bei drei Patienten festgestellt werden. Bei einem Patienten wurde eine Progression dokumentiert, ohne dass ein Schub abzugrenzen war (Abbildung 3).



NR: Nonresponder
Pat: Patient

Abbildung 3: **Korrelation zwischen Schubaktivität und EDSS-Progression**

Die Abbildung zeigt, dass nach 24 Monaten nicht bei allen Patienten mit einer Schubaktivität auch eine EDSS-Progression einher ging und das ein Patient eine EDSS-Progression zu verzeichnen hatte, ohne dass es zu einem Schubereignis gekommen war.

4.2.4 Nebenwirkungen im Studienverlauf

Mit zwei Ausnahmen (Pat 10, Pat 12) traten bei allen Patienten NW auf. In zwei Fällen führten diese zum Abbruch der Therapie (Pat 07 und 08). Nebenwirkungen waren insbesondere früh nach Therapiebeginn zu erwarten, traten in den ersten sechs Monaten jedoch nur bei drei Patienten auf (Pat 03, 08, 11) und waren bei diesen Patienten auch im Verlauf nicht komplett regredient.

Neun von den zwölf Patienten gaben mindestens zu einem Zeitpunkt Hautrötungen an der Injektionsstelle an. Bei drei der zwölf Patienten kam es zu grippeähnlichen Symptomen. In einem Fall kam es zur Erhöhung der Leberfermente (Pat 07) und in einem Fall konnten NAb nachgewiesen werden (08). Drei der zwölf Patienten berichteten sowohl über grippeartige Symptome als auch über Hautveränderungen. Die Nebenwirkungen waren mehrheitlich leicht bis moderat und konnten mit regelmäßiger oder nur bei Bedarf verabreichter Begleitmedikation (z.B. Nichtsteroidale Antirheumatika) gut beherrscht werden. Insgesamt ergab die Auswertung der Daten, dass Nebenwirkungen häufig beklagt wurden und auch im langfristigen Therapieverlauf persistieren können (Tabelle 7).

Tabelle 7: **Nebenwirkungen**

Diese Tabelle beschreibt die Art der Nebenwirkungen (NW) sowie die jeweiligen Schweregrade der NW unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. pro Patient und pro Zeiteinheit.

	Nebenwirkungen (Monat)											
Patient	1 – 6		7 – 12		13 - 24		25 - 36		37 - 48		49 - 60	
	Art	Grad	Art	Grad	Art	Grad	Art	Grad	Art	Grad	Art	Grad
1	–	–	–	–	–	–	–	–	A	1	–	–
2	–	–	–	–	A	2	A	2	A	2	A	2
3	B	2	B	2	B	2	B	2	–	–	–	–
4	–	–	–	–	B	1	–	–	A	1		
5	–	–	A	1	–	–	B	1	–	–		
6	–	–	–	–	A	1	A	1	A,C	1,1	A	1
7	–	–	–	–	A,C	1,3						
8	B	2	B	2	A	1	–	–	C	3		
9	–	–	A	2								
10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	B	2	–	–	–	–	A	1	A	1	A	1
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

- : Keine Nebenwirkungen
Blau: Patient nicht mehr unter Therapie mit IFN-β 1a s.c.

Art der Nebenwirkungen:
A: Hauterscheinungen
B: grippeähnliche Symptome
C: andere (Transaminasenerhöhung, neutralisierende Antikörper

Grad der Nebenwirkungen
1: leichte NW
2: moderate NW
3: schwerer NW (Therapie beendet)

4.3 Paraklinische Ergebnisse

4.3.1 Magnet-Resonanz-Tomographie

Das Ausgangs-MRT vor der Einstellung auf IFN-β 1a s.c. war bei allen Patienten pathologisch. Nach einer mehrjährigen Therapie mit IFN-β wurden bei acht Patienten bildmorphologische Verlaufskontrollen durchgeführt. Die Verlaufskontrollen wurden nach

durchschnittlich 59 Monaten durchgeführt (Tabelle 8).

Insgesamt zeigte sich bei vier der acht Patienten ein stabiler MRT-Befund, bei den anderen vier kam es jeweils in einem der vier Kriterien zu einer Befundverschlechterung. Drei der Patienten, die bildmorphologische Krankheitsprogression aufwiesen, hatten eine EDSS-Progression im Verlauf (Pat 02, 03, 11). Pat 12 hatte einen stabilen EDSS auf hohem Niveau. Keiner der Patienten zeigte einen neuen Gd-aufnehmenden Herd, passend zum klinischen Befund, der bei Durchführung der MRT im schubfreien Intervall jeweils stabil war.

Tabelle 8: **MRT-Verlaufskontrolle bei acht Patienten**

Nach durchschnittlich 59 Monaten wurde bei acht der zwölf Patienten ein weiteres MRT durchgeführt, welches mit dem Baseline-MRT verglichen werden konnte. Hierfür wurde ein möglichst spät im Studienverlauf und teilweise auch nach Beendigung des offiziellen Beaobachtungszeitraum durchgeführtes MRT gewählt. In der Gesamtbewertung wurde ein MRT, das in einem der vier Kriterien eine Befundverschlechterung aufwies, als verschlechtert angesehen (Gesamt). Dies zeigte sich bei der Hälfte der untersuchten Patienten.

		MRT-Befunde				
Patient	Monat	T2	KM	BH	A	Gesamt
1	66	=	=	=	=	=
2	52	=	=	=	↑	↑
3	79	↑	=	=	=	↑
4	76	=	=	=	=	=
5	47	=	=	=	=	=
6						
7						
8	36	=	=	=	=	=
9						
10						
11	49	=	=	↑	=	↑
12	67	=	=	=	↑	↑

= : stabiler Befung
↑ : bildmorphologische Progression
Blau: Patient zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mehr unter Therapie
T2: T2-Läsion im MRT
KM: Kontrastmittel-aufnehmende Herde
BH: Black holes
A: Atrophie

4.3.2 Evozierte Potentiale

Die VEP zum Zeitpunkt t0 waren bei fünf von zwölf Patienten pathologisch. Bei acht Patienten wurden im Verlauf Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Diese zeigten nach durchschnittlich 61,5 Monaten bei fünf Patienten einen stabilen Befund. Bei drei Patienten kam es zu einer Befundverschlechterung, wobei in einem dieser Fälle die Therapie bereits aufgrund von Progression und Übergang in eine chronische Verlaufsform abgebrochen worden war.

Die Nachuntersuchungen der SSEP erfolgten nach durchschnittlich 69,3 Monaten bei sieben Patienten. Im SSEP der oberen Extremität wurden bereits zur Baseline bei drei Patienten pathologische Befunde gemessen, im SSEP der unteren Extremität bei allen sieben Patienten. Während in den Messungen der OE im Verlauf drei von sieben Patienten stabile Befunde hatten, ergaben die Messungen der UE bei allen sieben Patienten eine weitere Befundverschlechterung.

Die MEP wurden bei sechs Patienten nach durchschnittlich 69,6 Monaten kontrolliert. Vier Patienten hatten dabei sowohl in der OE als auch in der UE stabile Befunde. Zwei Patienten zeigten eine Befundverschlechterung gegenüber der Baseline. Diese Patienten hatten die IFN-β-Therapie zum Zeitpunkt der zweiten Messung aufgrund von Progression der Krankheit abgesetzt.

Insgesamt zeigte sich, mit Ausnahme von Pat 07, bei dem nur das VEP nach siebenmonatiger Therapie als Verlaufskontrolle zur Verfügung stand, bei allen Patienten zumindest in einer der Messungen eine Verschlechterung der paraklinisch erhobenen Befunde. Insbesondere zeigte sich eine Latenzverzögerung in den somatosensibel evozierten Potentialen. Bevorzugt waren die unteren Extremitäten betroffen (Tabelle 9). Dies korrespondiert mit dem letzten, in dieser Studie nach ca. 60 Monaten dokumentierten, EDSS, welcher bei den elektrophysiologisch untersuchten Patienten zwischen 3,5 und 5,5 lag.

Tabelle 9: **Veränderung der evozierten Potentiale (EP) im Vergleich zur Baseline-Untersuchung**

Bei den Patienten, bei denen Ausgangswerte und Verlaufskontrollen vorlagen wurde eine möglichst spät durchgeführte Untersuchung mit der jeweiligen Baseline-Untersuchung verglichen. Die EP wurden bei klinischer Indikation bestimmt. Daher liegen nicht immer Ergebnisse für alle drei Untersuchungen vor. In der Spalte "Gesamt" wird angezeigt, ob es in einer der Messungen zu pathologischen Veränderungen und damit zu einer paraklinischen Befundprogredienz kam.

		Evozierte Potentiale					
Patient	Monat	VEP	SSEP-OE	SSEP-UE	MEP-OE	MEP-UE	Gesamt
1	80	=	↑	↑	=	=	↑
2	78	=	↑	↑	=	=	↑
3	79	↑	=	↑	=	=	↑
4							
5	64	↑	↑	↑	↑	↑	↑
6							
7							
8	68	=	=	↑	=	↑	↑
9	7	=					=
10							
11	49	=	=	↑	=	=	↑
12	67	↑	↑	↑			↑

VEP: Visuell evozierte Potentiale
SSEP: Somatosensibel evozierte Potentiale
MEP: Motorisch evozierte Potentiale
OE: Obere Extremität
UE: Untere Extremität
= : stabiler Befund
↑ : Verschlechterung
Blau: Patient nicht mehr unter Therapie mit IFN-β 1a s.c.

4.4 Genexpressionsveränderungen unter IFN-β-Therapie und Clustering

Im Rahmen der Mikrochipanalyse wurden 18862 Gene in Hinblick auf ihr Expressions-Niveau im zeitlichen Verlauf untersucht. Durch die in Kapitel 3.4.3 beschriebene Filtermethode wurden die Gene ermittelt, deren Expression unter der Therapie mit IFN-β signifikant moduliert wurde. Nach zwei Tagen waren im Vergleich zur Baseline 62 Gene signifikant hoch- oder herunterreguliert. Nach vier Wochen, zwölf Monaten und 24 Monaten zeigten entsprechend 74, 34 und acht Gene eine deutliche

Expressionsveränderung. Dabei kam es zu großen Überschneidungen. Insgesamt wurden 96 verschiedene Gene als unter der Therapie signifikant moduliert gefiltert (Tabelle A1 im Anhang). Davon waren 74 Gene hoch- und 21 Gene herunterreguliert. Ein Gen zeigte eine Hochregulation nach zwei Tagen sowie eine Herunterregulation nach vier Wochen (MGAM). Die Expressionslevel der 96 Gene sind in Abbildung 4 als Heatmap dargestellt. Dabei handelt sich um die Visualisierung einer Datenmatrix, die die Expressionslevel der einzelnen Gene in den einzelnen Patienten enthält.

Anhand ihrer Expressionsveränderungen wurden die 96 Gene mittels Clusteranalyse in sechs Gruppen eingeteilt. Cluster 1 ist mit 54 Genen die größte Gruppe und umfasst Gene, die unter IFN-β über den gesamten Zeitraum hochreguliert waren. Darin enthalten sind bekannte durch Interferon stimulierte Gene, beispielsweise MX1 und damit co-exprimierte Gene wie OAS1-3, IFI6, -27, -35, -44, -44L sowie die Transkriptionsfaktoren STAT1 und IRF7. Cluster 2 setzt sich aus vier Genen zusammen (EGR1, EGR2, STAP1 und TCL1A), die erst nach zwölf bzw. 24 monatiger Therapie hochreguliert waren. Cluster 3 (neun Gene, z.B. C1QA, -B, -C, C3AR1 und LILRA3) und Cluster 4 (12 Gene, z.B. MMP9, -25, CD163, CYP4F3) beinhalten Gene, die nach zwei Tagen hochreguliert, nach einem Monat jedoch bereits wieder auf dem Baseline-Niveau exprimiert waren. Cluster 5 beinhaltet ebenfalls Gene, die zunächst hoch-, später jedoch herunterreguliert sind (u.a. ITGA2B, CLU). Die fünf Gene in Cluster 6 zeigten eine Herunterregulation im Vergleich zur Baseline (FCER1A, IL8, G0S2, RPS23, ENSG00000183700).

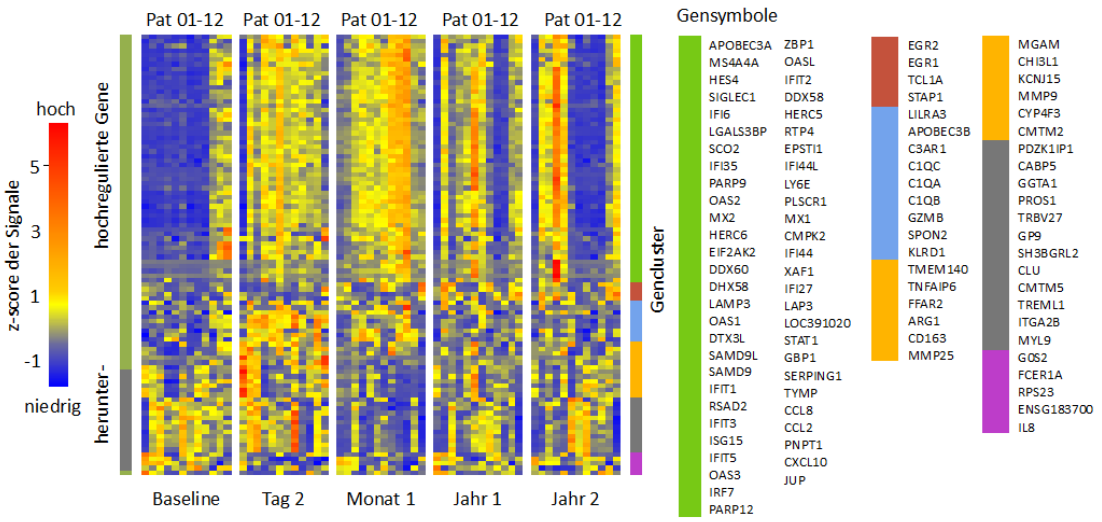


Abbildung 4: **Heatmap der Expression unter Therapie modulierter Gene**

Die Expression der 96 Gene ist für alle Patienten zu allen fünf Zeitpunkten dargestellt, wobei rot hohe Expression und blau niedrige Expression anzeigt. Die Daten wurden standardisiert, so dass die Messwerte einen Mittelwert von 0 und eine Varianz von 1 hatten. Der so berechnete Z-Score wird angegeben in Standartabweichungen vom Mittelwert. Die Mehrheit der Gene war unter Therapie höher exprimiert (grüner Balken links), ca. ein Viertel der Gene war unter der Therapie niedriger exprimiert (grauer Balken links). Die Gene wurden anhand ihrer Expressionsdynamik in sechs Cluster eingeteilt, welche rechts als sechs farblich unterschiedliche Balken mit den jeweiligen Gensymbolen dargestellt sind. Grün stellt das Cluster 1 dar, welches die typischen Interferon-regulierten Gene (IRG) enthält. Die Heatmap visualisiert deutliche interindividuelle Unterschiede in der Genexpression zwischen den Patienten. Beispielsweise wird deutlich, dass drei Patienten bereits vor Therapiebeginn eine relativ hohe Expression der IRG aufwiesen. Nach zwei Jahren war das Expressionsniveau der IRG bei sechs Patienten hoch und bei sechs Patienten niedrig.

In der Heatmap zeigen sich deutliche interindividuelle Unterschiede im Expressionsmuster der Patienten sowohl vor Therapiebeginn als auch unter der Therapie. Prätherapeutisch hatten drei Patienten (Pat 10, 11 und 12) bereits hohe Transkript-Level von MX1 und anderen IRG (Interferon-regulierte Gene). Hier kann man von einer hohen endogenen Aktivität des Interferon-Signalwegs ausgehen. Nach der ersten Injektion von IFN-β 1a s.c. wurde die MX1-Expression bei allen anderen Patienten außer Pat 01 auf ein vergleichbares Expressionsniveau hochreguliert. Pat 01 war nicht therapienaiv, da sie bereits zuvor, außerhalb der Studie, mit IFN-β 1a s.c. behandelt wurde. Das MX1-Expressionslevel zeigte bei dieser Patientin über den gesamten Studienzeitraum niedrige Werte. Nach einem

Jahr war MX1 noch bei neun von zwölf Patienten stark exprimiert. Nach zwei Jahren hatten nur noch sechs Patienten ein erhöhtes MX1-Transkript-Level. Von diesen sechs Patienten war eine Patientin wie beschrieben nicht therapienaiv (Pat 01). In einem weiteren Fall kam es während des zweiten Jahres zu unregelmäßiger Medikamenteneinnahme (Pat 09). Bei einer anderen Patientin wurden im nachfolgenden Verlauf NAb festgestellt (Pat 08). Es ist davon auszugehen, dass diese Patientin bereits zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme NAb-positiv war. Eine weitere Patientin hatte das Medikament ein halbes Jahr zuvor aufgrund von NW abgesetzt (Pat 07). Bei Pat 06 war im zweiten Jahr eine deutliche Krankheitsaktivität mit drei Schüben zu verzeichnen, bei Pat 10 kam es im zweiten Jahr im Vergleich zu t0 zu einer deutlichen EDSS-Verschlechterung um 2,5 Punkte.

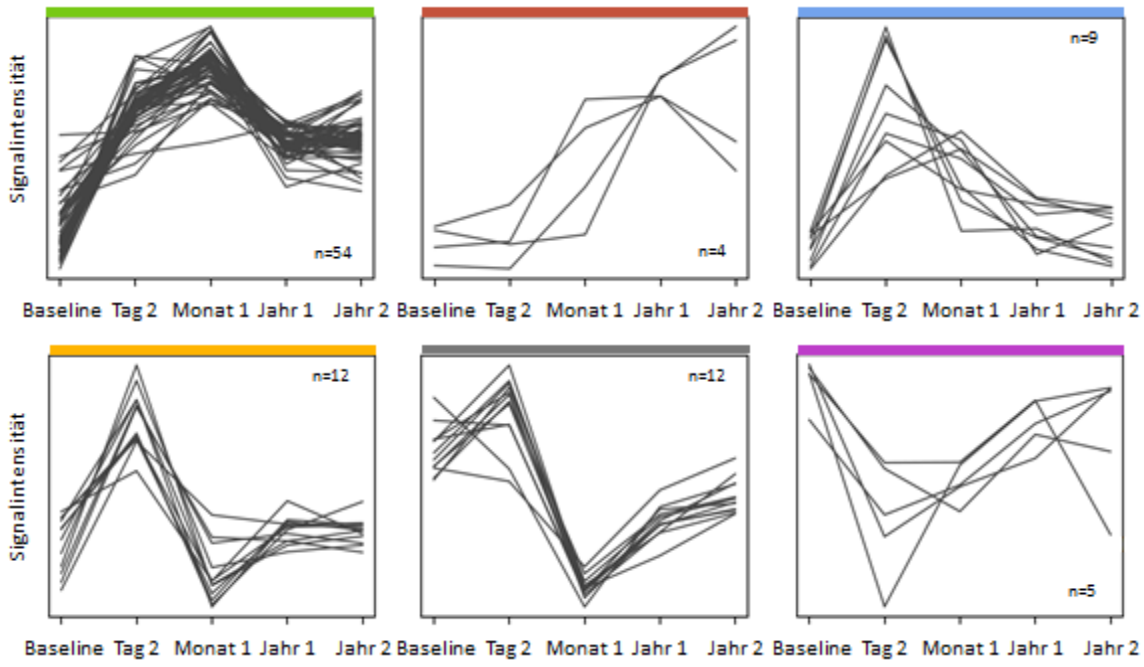


Abbildung 5: **Clustering der 96 gefilterten Gene**

Die Einteilung der gefilterten Gene in sechs Cluster erfolgte anhand ihrer Expressionsdynamik mittels hierarchischem Clustering. Die mRNA-Expressionslevel wurden standardisiert (Varianz = 1, SD = 0), damit die hoch und niedrig exprimierten Gene auf einem vergleichbaren Niveau beurteilt werden können. Die Cluster 1-6 sind von links oben nach rechts unten dargestellt. Dargestellt ist die Anzahl der zugeordneten Gene und der jeweilige p-Wert sowie die Expressionskurven, welche die mittlere Expression der jeweiligen Gene im zeitlichen Verlauf darstellt.

Abbildung 5 zeigt die Expressionsdynamik der gefilterten Gene der Cluster 1-6. Die Standardisierung führt dazu, dass hoch- und niedrig exprimierte Gene auf einem vergleichbaren Niveau dargestellt werden können. Abgebildet ist die mittlere Expression der Gene in den zwölf Patienten. Es kommen so beispielsweise mittlere Werte der Signalintensitäten für die IRG aus Cluster 1 zum Zeitpunkt t4 zur Darstellung, obwohl die Expression dieser Gene zum Zeitpunkt t4 bei sechs der Patienten hoch- und bei den anderen sechs Patienten niedrig ist, wie aus Abbildung 4 hervorgeht. Die farbliche Zuordnung der Cluster stimmt mit Abbildung 4 überein.

Die Verwendung des Haematlas-Datensatzes ergab, dass 48 der 96 Gene von Monozyten exprimiert werden. In den anderen PBMC-Zellpopulationen wurden hingegen etwas weniger Gene exprimiert. Für vier der gefilterten Gene gab es im Haematlas-Datensatz keine Expressionsdaten (siehe Tabelle A1 im Anhang).

4.5 Überrepräsentierte Genfunktionen

Es wurde nach Funktionen und Signalwegen gesucht, die für die gefilterten Gene besonders typisch sind. Hierzu wurden die Gene funktionellen Kategorien zugeordnet. Verglichen mit den Funktionen, die unter allen in PBMC exprimierten Genen zu erwarten wären, zeigten sich zehn Gengruppen überrepräsentiert (Tabelle 10).

Unter Verwendung der KEGG-Datenbank konnten zwei überrepräsentierte Signalwege mit je sechs assoziierten Genen gefunden werden. Von den gefilterten Genen gehörten sechs Gene zu der KEGG-Gengruppe "*Complement and coagulation cascade*", darunter die Gene C1QA, -B, -C und C3AR1, welche früh unter der Therapie hochreguliert wurden und sich in Cluster 3 befanden. Zu der Gengruppe "*RIG-I-like receptor signaling pathway*" ließen sich sechs Gene zuordnen, die hauptsächlich in Cluster 1 zu finden waren (neben CXCL10, DDX68, DHX58 und ISG15, der Transkriptionsfaktor IRF7) sowie IL8. Acht Gengruppen der SABiosciences-Datenbank waren in den gefilterten Genen überrepräsentiert. Erwartungsgemäß waren die Gengruppen „*IFN a/b Response*“ und „*IFN and receptor*“ besonders typisch für die gefilterten Gene. Alle Gene dieser Gruppen waren in Cluster 1 zu finden und wurden durch IFN-β hochreguliert. In der Gengruppe "*Angiogenesis*" fanden sich sowohl hochregulierte Gene aus Cluster 1 (CCL2, CXCL10, TYMP), als auch herunterregulierte Gene wie MMP9 und IL8. Auch in Hinblick auf die Genfunktionen zeigte sich eine Überlappung. Einige Gene, beispielsweise CXCL10 und

IL8, fanden sich in mehreren Gengruppen der beiden Datenbanken.

Tabelle 10: **Überrepräsentierte Funktionen, Prozesse und Signalwege**

Die Gengruppen wurden den Datenbanken KEGG und SABioscience entnommen. Beispielsweise sind 14 der 96 gefilterten Gene Mitglieder der Gengruppe "Interferon alpha, beta Response" (Count). Die unter Berücksichtigung der Häufigkeit unter allen exprimierten Genen zu erwartende Anzahl an zugehörigen Genen lag bei 0,51 (ExpCount). Damit gehören deutlich mehr Gene zu dieser Gruppe als erwartet (p-Wert=$6{,}67*10^{-17}$), was bedeutet, dass diese Gengruppe unter den regulierten Genen überrepräsentiert ist.

Datenbank	Name	P-Wert	ExpCount	Count
SABiosciences	Interferon alpha, beta Response	6,67E-17	0,51	14
SABiosciences	Interferon (IFN) and Receptor	2,75E-16	0,44	13
KEGG database	Complement and coagulation cascades (hsa04610)	2,53E-07	0,27	6
SABiosciences	Inflammatory Response and Autoimmunity 384HT	9,61E-07	1,69	11
SABiosciences	Chemokines & Receptors	3,45E-06	0,42	6
KEGG database	RIG-I-like receptor signaling pathway (hsa04622)	3,65E-06	0,42	6
SABiosciences	Dendritic & Antigen Presenting Cell	9,24E-06	0,49	6
SABiosciences	Angiogenesis	6,29E-05	0,42	5
SABiosciences	JAK / STAT Signaling Pathway	2,09E-04	0,54	5
SABiosciences	HIV Infection and Host Response	2,38E-04	0,56	5

4.6 Genregulation durch Transkriptionsfaktoren

In der Liste der gefilterten Gene fanden sich Gene, die zur gleichen Gen-Familie gehören und die unter der Therapie co-exprimiert wurden. Die Clusteranalyse zeigte insbesondere in Cluster 1 eine deutliche Co-Regulation von Genen auch unterschiedlicher Gen-Familien. Diese gleichsinnige Regulation der Expression lässt eine große Ähnlichkeit in der Regulatorregion der Gene vermuten. Die Regulation der Genexpression erfolgt vor allem über TF. Die Aktivität von bestimmten TF wird vermutlich durch die Therapie moduliert. Bindestellen für TF finden sich in den Promotorregionen der Gene. Zur näheren Analyse der Regulationsmechanismen wurden daher die Regulatorregionen der Gene mit Hilfe der drei Datenbanken UCSC tfbsConsSites, cisRED Human 9 und SwissRegulon im Hinblick auf überrepräsentierte TFBS untersucht. Dabei fanden sich fünf überrepräsentierte TFBS, welche sich also besonders häufig in den Promotorregionen der 96 gefilterten Gene fanden (Abbildung 6).

Bindestellen für die TF IRF (Interferon Regulationsfaktor) 1, IRF2 und IRF7 waren nach den Vorhersagen von allen drei verwendeten Datenbanken in den Promotorregionen der gefilterten Gene überrepräsentiert. Vorhersagen für Bindestellen für ISGF3 waren nur in der Datenbank UCSC vorhanden. Dabei handelt es sich um einen Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9. Es fanden sich in der Datenbank SwissRegulon außerdem Vorhersagen für Bindestellen für „DMAP1, NCOR1, NCOR2, SMARC“ einer TF-Familie, die über die Modulation von Chromatin die Transkription reguliert sowie für PRDM1, einen IFN-Repressor.

Diese genannten TF regulieren also maßgeblich die gefilterten Gene. Die jeweiligen DNA-Bindemotive sind sich sehr ähnlich im Hinblick auf die präferierten Basen an bestimmten Positionen in der DNA-Sequenz. An diese ähnlichen Bindemotive binden TF, die sich ebenfalls phylogenetisch ähneln, wie bereits aus den Gensymbolen, beispielsweise der TF IRF1, -2 und -7, hervorgeht.

		UCSC tfbsConsSites	cisRED Human 9	SwissRegulon RefSeq	Total
	IRF1-2	18 : 4.7 (7.93E-07)	12 : 3.5 (1.71E-04)	48 : 13.7 (8.83E-17)	52
	IRF7	10 : 4.2 (9.65E-03)	15 : 3.9 (7.86E-06)	49 : 12.5 (2.97E-19)	54
	ISGF3	14 : 3.6 (1.11E-05)	-	-	14
	PRDM1	-	-	42 : 21.8 (3.53E-06)	42
	DMAP1, NCOR1-2, SMARC family	-	-	22 : 5.8 (4.42E-08)	22
					184

Abbildung 6: **Überrepräsentierte Transkriptionsfaktor-Bindemotive**

Links ist das Basenmotiv dargestellt, gefolgt von den Gensymbolen der Transkriptionsfaktoren (TF). Das Bindemotiv ist jeweils definiert durch die Position und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens spezifischer Basen (präferierte Basen). Ein großer Buchstabe bezeichnet dabei eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen der präferierten Base an der betreffenden Position wie z.B. für das Vorkommen von Adenin (A). Ein kleiner Buchstabe bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Base an dieser Position gering ist. Des Weiteren sind in dieser Abbildung die Anzahl der gefilterten Gene, die das entsprechende Bindemotiv in ihrer Promotorregion haben entsprechend den Vorhersagen der drei Datenbanken dargestellt. Beispielsweise waren für den TF ISGF3 Vorhersagen für Bindestellen im Genom nur in der Datenbank UCSC tfbsConsSites vorhanden. 14 der 96 gefilterten Gene haben dieses Bindemotiv in ihrer Promotorregion (z.B. MX1, STAT1, MMP25), wobei dies aus dem Vergleich mit allen PBMC-exprimierten Genen nur für 3,6 Gene zu erwarten war. Mit einem p-Wert von 1,11 x10 $^{-5}$ war diese Transkriptionsfaktorbindestelle in den gefilterten Genen damit überrepräsentiert.

4.7 Genregulatorische Interaktionen

Insgesamt wurden in der Analyse der TFBS 184 Interaktionen zwischen Genen und TF vorhergesagt. Unter Verwendung der Software Cytoscape wurden die Interaktionen in einem Netzwerk visualisiert. Das Netzwerk zeigt die unter Therapie hoch- und herunterregulierten Gene sowie die TF, die durch Bindung an TFBS in den Promotorregionen die Transkription dieser Gene regulieren. Dabei interagierten die fünf TF mit 67 der 96 Gene durch insgesamt 184 TF-Gen-Interaktionen.

Zur Darstellung kommt ein sehr dichtes Netzwerk mit vielen Überlappungen (Abbildung 7). Von den 96 Genen haben 52 eine TFBS für den TF IRF1-2 und 54 Gene eine TFBS für den TF IRF7. Davon haben 47 nach den Vorhersagen der Datenbanken eine Bindestelle für beide TF. Für den TF PRDM1, einen Repressor von durch IFN-β stimulierter Genexpression, fanden sich 42 Interaktionen, häufig mit unter IFN-β-Therapie herunterregulierten Genen. IRF7 und STAT1 (als Komponente des ISGF3 Komplexes) regulieren als TF die Transkription der gefilterten Gene, fanden sich jedoch ebenfalls unter den durch IFN-β hoch-regulierten Genen.

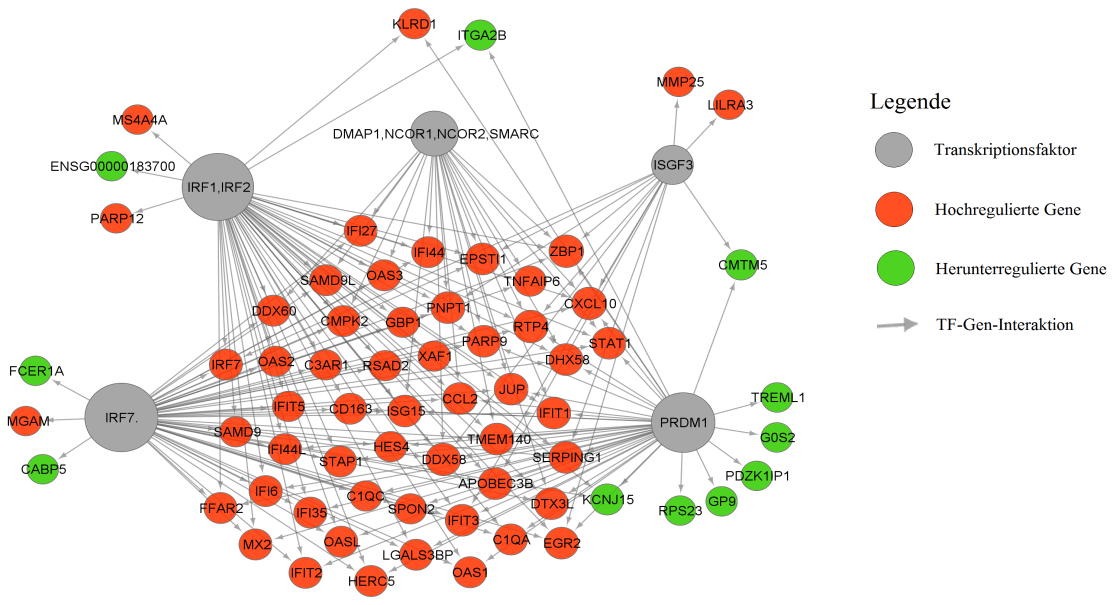


Abbildung 7: **Gen-Interaktions-Netzwerk**

Die Abbildung stellt die überrepräsentierten Transkriptionsfaktor (TF) -Gruppen dar (grau) sowie die hoch- (rot) und herunter-regulierten Gene (grün). Wenn in der Promotorregion eines Genes eine Bindestelle für einen der TF vorhergesagt war, wurde dies als eine Interaktion visualisiert. Deutlich wird, dass die TF IRF1, IRF2 und IRF7 die meisten, insbesondere hochregulierte Gene regulieren. PRDM1 interagiert hingegen häufig mit herunterregulierten Genen. Die meisten Gene haben Bindestellen für mehr als einen der TF. Es kommt ein dichtes Gennetzwerk aus Interaktionen zwischen überrepräsentierten TF und den unter Therapie differentiell exprimierten Genen zur Darstellung.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der klinische Verlauf von zwölf MS-Patienten unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. über den Studienzeitraum von fünf Jahren klinisch und paraklinisch evaluiert. Außerdem erfolgte eine Genexpressionsanalyse im Blut dieser Patienten, um Expressionsveränderungen im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Dazu wurden aus Blutproben, welche vor Therapie-beginn und zu definierten Zeitpunkten unter der Therapie abgenommen wurden, PBMC separiert und die darin enthaltene mRNA mittels RNA-Mikroarrays untersucht. Um die pharmakologischen Effekte von IFN-β besser zu verstehen, war es außerdem wichtig, die regulatorischen Interaktionen zwischen den in ihrer Expression veränderten Genen näher zu beleuchten. Auf Basis der Expressionsdaten und anhand der überrepräsentierten TFBS in den Promotorregionen der gefilterten Gene wurden Transkriptionsfaktoren bestimmt, die diese Gene hauptsächlich regulieren. Sie wurden in einem Netzwerk aus Interaktionen visualisiert.

5.1 Klinische Parameter und Verlauf

Mit einem mittleren EDSS von 2,3 waren die Patienten bereits vor Therapiebeginn relativ deutlich betroffen im Vergleich zu publizierten Studien anderer Arbeitsgruppen, bei denen der Baseline-EDSS zwischen 1,0 und 2,0 lag (Panitch et al. 2002, Waubant et al. 2003, Tomassini et al. 2006, Hecker et al. 2012). Von den zwölf Patienten der vorliegenden Studie beendeten zwei die Therapie in den ersten 24 Monaten und damit vor der letzten Blutentnahme. In einem Fall erfolgte dies aufgrund von NW, im zweiten Fall aufgrund von Noncompliance. Im weiteren Verlauf der Studie brach eine Patientin die Behandlung wegen eines Kinderwunsches ab. Zwei weitere Patienten mussten die Therapie wegen vermuteter mangelnder Wirksamkeit beenden, wobei bei einem dieser Patienten ein Übergang in eine chronische Verlaufsform und beim zweiten Patienten NAb festgestellt wurden. Somit betrug die Abbruchrate im gesamten Studienverlauf von 60 Monaten fünf von zwölf.

Die Abbruchrate innerhalb von fünf Jahren betrug in Studien, die sich bisher mit dem Thema der Adhärenz unter der IFN-β-Therapie auseinander setzten, zwischen 17% und 39,9% (Ruggieri et al. 2003, O´Rourke und Hutchinson 2005, Río et al. 2005a). Die Adhärenz der Patienten der Rostocker Kohorte ist also vergleichbar mit anderen Studien.

Die Adhärenzrate ist in der Regel in klinischen Studien höher anzunehmen als in der Alltagssituation, da die Patienten engmaschiger betreut und Probleme eher angesprochen werden sowie Erwartungen realistisch besprochen werden können. Die Hauptursachen für eine Beendigung der Therapie sind dabei abhängig von der Therapiedauer (Patti 2010): In der Frühphase der Therapie führen häufig Nebenwirkungen zum Therapieabbruch, im Verlauf kommt es insbesondere aufgrund fortdauernder Krankheitsaktivität trotz Therapie zum Absetzen des Medikaments. Gründe für ein späteres Beenden der Therapie können außerdem eine Therapiemüdigkeit, welche zu Nachlässigkeit bei der Einnahme führt, sowie unrealistische Erwartungen an die Therapie sein. In bisher durchgeführten Studien mit IFN-β in der MS-Therapie erfolgte der Therapieabbruch am häufigsten in den ersten 6-24 Monaten (Tremlett und Oger 2003, Río et al. 2005a). In dem hier untersuchten Patientenkollektiv konnte diese Verteilung nicht bestätigt werden. Die Studien sind jedoch nicht uneingeschränkt vergleichbar, da häufig Patienten mit SCMS zusammen mit Patienten mit RRMS untersucht wurden (O´Rourke und Hutchinson 2005, Río et al. 2005a). Außerdem vermindert die geringe Anzahl an Patienten die Aussagekraft der Ergebnisse der vorliegenden Studie.

5.2 Therapieansprechen

Schübe und zunehmende Behinderung sind für den Patienten sichtbare und einschränkende Zeichen seiner Erkrankung und die Erwartung an die Therapie ist eine Verminderung der Schubrate und die Verhinderung bleibender Einschränkungen. Die Kriterien für Response waren in dieser Studie daher ein stabiler EDSS und das Ausbleiben von Schüben. Als Nonresponder wurde ein Patient gewertet, der entweder mindestens ein Schubereignis oder eine persistierende Verschlechterung des EDSS um 1,0 Punkte über drei Monate hatte. Diese Kriterien wurden gewählt, um eine möglichst klare Abgrenzung von Respondern und Nonrespondern vornehmen zu können.

Die Studie ergab, dass nach den hier festgelegten Kriterien nach zwei Jahren fünf der zehn nach zwei Jahren unter der Therapie verbliebenen Patienten Nonresponder in Bezug auf den EDSS und sieben Patienten in Hinblick auf einen Schub waren. Nach einem daraus entwickelten Score, nach dem nur ein schubfreier und progressionsfreier Patient ein Responder war, ergab sich ein Verhältnis von acht zu zwei zwischen Nonrespondern und Respondern. Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Patienten zeigten sich

insgesamt vergleichbare Ergebnisse bezüglich der klinischen Daten. Bei den männlichen Studienteilnehmern war, in Übereinstimmung mit der MS-Literatur (Tomassini et al. 2006), ein geringfügig schlechterer Verlauf zu verzeichnen. Deutlich wird in dieser Studie eine ausgeprägte Heterogenität zwischen den Patienten im Hinblick auf den Krankheitsverlauf und das klinische Bild. Es bestehen bei einigen Patienten nach dem Studienzeitraum von fünf Jahren und noch längerer Krankheitsdauer weiterhin keine permanente Funktionseinschränkungen, was sich in einem EDSS von 0 ausdrückt. Bei anderen Patienten besteht hingegen eine deutliche bleibende Funktionseinschränkung im Alltag.

Nach den hier verwendeten Kriterien waren im Verlauf von fünf Jahren alle adhärenten Patienten Nonresponder. Der Begriff Nonresponder suggeriert, dass die Therapie bei dem Betreffenden keinerlei Nutzen hat. Die Entscheidung, wann ein Patient von der IFN-β-Therapie nicht profitiert, ist im klinischen Alltag im Einzelfall jedoch z. T. schwer zu treffen (Rudick und Polman 2009). Es gibt für Response und Nonresponse derzeit keine einheitliche Definition. Je nachdem, wie streng die Kriterien sind, ergeben sich unter der Therapie mit IFN-β Nonresponderraten von 7-49% (Río et al. 2006). Als Zeichen von klinischer Krankheitsaktivität werden häufig sowohl Progression als auch Schübe gewertet. Die mittels MRT nachweisbare Krankheitsaktivität bleibt jedoch auch häufig subklinisch (Rudick et al. 2001). Man kann also nicht schlussfolgern, dass die Krankheit bei stabilem EDSS und ohne Schübe nicht aktiv ist. Bei einer Therapie, die in den Zulassungsstudien die Schubrate um 30% verringern konnte, ohne bei allen Patienten Schubfreiheit zu erzielen (PRISM Study Group 1998), bedeutet ein erneuter Schub demzufolge nicht, dass der Patient nicht auf die Therapie anspricht (Freedman 2004). Bei der MS handelt es sich um eine chronische, schubförmige oder progrediente Erkrankung, deren Schubfrequenz man mit der Therapie allenfalls reduzieren kann. Für den klinischen Gebrauch sind die in dieser Studie verwendeten Kriterien daher nicht günstig, um ein Therapieversagen festzustellen.

Da man im Einzelfall nicht belegen kann, wie der natürliche Krankheitsverlauf des Patienten ohne die Therapie gewesen wäre, führen sowohl Schubaktivität als auch langsame Progression nicht immer zum sofortigen Abbruch der Therapie mit IFN-β. Im klinischen Alltag unterstützen die Empfehlungen der Canadian Multiple Sclerosis Working Group den behandelnden Arzt dabei, das individuelle Therapieansprechen eines Patienten anhand der Parameter Schubaktivität, Krankheitsprogression und MRT-Aktivität zu

evaluieren (Freedman et al. 2004, DGN 2012).

Insgesamt zeigte sich bei den Patienten dieser Studie trotz Therapie auch im Verlauf eine hohe Krankheitsaktivität. Möglicherweise resultiert dies aus einer bereits bei Studienbeginn bestehenden hohen Krankheitsaktivität. Das scheinbar limitierte Therapieansprechen, welches sich im Verlauf bei allen Patienten durch EDSS-Progression und Schubaktivität äußerte, hatte zunächst wenig Auswirkungen auf das Behandlungsregime. Zum Zeitpunkt der Studie hatte sich die konsequente Messung der NAb im klinischen Alltag international noch nicht etabliert. Auch befanden sich die sehr wirksamen Medikamente der Eskalationstherapie wie Natalizumab und Fingolimod noch in der Phase der klinischen Erprobung und würden heute möglicherweise früher zum Einsatz kommen (DGN 2012).

In den MRT-Untersuchungen konnte interessanterweise trotz klinischer Krankheitsprogression einiger Patienten insgesamt nur wenig bildmorphologische Progredienz beobachtet werden. Bei vier von acht Patienten zeigte sich nach einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von 59 Monaten eine bildmorphologische Befundverschlechterung in einem Kriterium. Ansonsten ergaben sich stabile Befunde. Es wurden jedoch nur cerebrale MRT ausgewertet. Eine Verschlechterung im spinalen MRT könnte so unbemerkt geblieben sein. Außerdem besteht bisher keine Möglichkeit, kortikale Läsionen im konventionellen MRT sicher darzustellen, welche jedoch im Verdacht stehen, erheblich zur klinischen Manifestation der MS beizutragen (Kutzelnigg et al. 2005). Regelmäßige MRT-Kontrollen aller Patienten zu definierten Zeitpunkten waren im Studiendesign nicht vorgesehen und sind im klinischen Alltag schwer zu realisieren, da auch Patienten mit subjektivem Wohlbefinden und stabilem klinischen Befund untersucht werden müssten. Für aussagekräftige Ergebnisse der paraklinischen Veränderungen im Verlauf der Therapie wären jedoch regelmäßige MRT-Untersuchungen aller Patienten wünschenswert.

5.3 Nebenwirkungen unter Interferon-β

Bis auf zwei Patienten hatten in dieser Studie alle Patienten Nebenwirkungen, jedoch nicht, wie erwartet, vorwiegend in den ersten sechs Monaten (in diesem Zeitraum traten nur bei drei von zwölf Patienten Nebenwirkungen auf), sondern meist erst im späteren Verlauf. Zusätzliche Gründe für ein späteres Auftreten können eine selektive Wahrnehmung durch Unzufriedenheit sein und eine sich einstellende Therapiemüdigkeit (Costello et al. 2008).

Möglicherweise werden NW zu Beginn der Therapie auch eher toleriert, in der Hoffnung, dass im Verlauf der Behandlung eine Gewöhnung des Körpers an das Medikament eintritt und die Nebenwirkungen abnehmen.

Die häufigsten Nebenwirkungen der Patientengruppe waren Rötungen an der Injektionsstelle und Grippe-ähnliche Symptome. In zwei Fällen kam es zum Therapieabbruch aufgrund von NW. Davon wurde eine Patientin positiv auf NAb getestet. Eine Verminderung der biologischen Wirksamkeit durch NAb konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (PRISM Study Group 1998, Giovannoni et al. 2002, Hesse et al. 2009). Bei der Ausdehnung des Studienzeitraums der PRISM-Studie auf vier Jahre konnte erstmalig auch eine Reduktion der klinischen Wirksamkeit durch NAb belegt werden (PRISMS Study Group 2001). Dies wurde in weiteren Studien bestätigt (Boz et al. 2007, Killestein und Polman 2011). NAb wurden in der vorliegenden Studie nicht regelhaft untersucht, lediglich zweimal bei Verdacht auf Therapieversagen. Dabei war das Ergebnis in einem Fall positiv und führte zum Beenden der Therapie und in einem Fall negativ. Retrospektiv muss gesagt werden, dass eine Messung bei allen Patienten sinnvoll gewesen wäre, um NAb als Ursache von vermindertem Therapieansprechen nachzuweisen oder auszuschließen.

5.4 Genexpressionsveränderungen nach Therapiebeginn

Durch die Analyse der Transkriptionsdaten ergab sich ein Einblick in die molekularen Effekte von IFN-β. Es zeigten sich 96 Gene unter der Therapie in ihrer Expression signifikant verändert. Darunter fanden sich vor allem immunologisch relevante Gene wie ISG15, CXCL10 sowie Gene der IFI- (interferon induced protein) und OASL-Familie (2'-5'-oligoadenylate synthetase), von denen einige bereits in anderen Mikrochip-Studien als IRG beschrieben wurden (Comabella et al. 2009, Goertsches et al. 2010). Es zeigte sich eine hohe Überlappung der gefilterten Gene mit der Studie von Goertsches et al., die eine vergleichbare Transkriptomanalyse mit Patienten unter der Therapie mit IFN-β 1b darstellt (Goertsches et al. 2010). Mehrheitlich handelte es sich dabei um hochregulierte Gene wie neben bekannten IRG (MX1, RSAD2, STAT1) beispielsweise CMPK2 und FFAR2. Unter den herunterregulierten Genen konnte FCER1A in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich bereits nach der ersten Injektion eine starke Expressionsveränderung, wie sie auch in anderen Studien registriert wurde (Goertsches at

al. 2010, Hecker et al. 2010). Nach der Initialphase, in der der Körper auf das neue Medikament reagiert, persistierte diese mehrheitlich (Hecker et al. 2010). Gene, die unter der IFN-β-Therapie früh hochreguliert waren, zeigten sich auch im Verlauf weiterhin hochreguliert (Tabelle A1 im Anhang). Dies spricht auch für eine gute Konsistenz der Daten. Nur wenige Gene waren erst nach zu einem späteren Zeitpunkt hochreguliert (EGR1, EGR2, STAP1, TCL1A (Cluster 2)). Die Hochregulation der IRG zeigte sich am deutlichsten nach einem Monat und einem Jahr.

Ein typischer Vertreter der IRG ist MX1. In der vorliegenden Arbeit war MX1 entsprechend unter der IFN-β-Therapie hochreguliert. Es bestand außerdem eine enge Korrelation mit anderen IRG wie der Gruppe der IFI und der OAS-Gene. Bei drei der zwölf Patienten dieser Arbeit zeigte sich bereits zum ersten Zeitpunkt (Baseline), also vor Therapiebeginn, auf mRNA-Ebene ein spontan erhöhtes Expressionslevel von MX1 und anderen IRG sowie hohe Level von STAT1/2 und JAK2. Dies spricht dafür, dass die endogene IFN-β-Aktivität über den JAK/STAT Signalweg bei diesen drei Patienten bereits sehr hoch war. Bei zwei dieser drei Patienten blieb das Expressionlevel der IFN-β-Response-Gene über zwei Jahre hinweg konstant hoch, bei einem Patienten fiel es im Verlauf ab. Diese drei Patienten zeigten einen klinisch stabilen Verlauf. Nach zwei Jahren waren zwei der drei Patienten ohne EDSS-Progression und der dritte ohne Schub. Eine verminderte Wirksamkeit von IFN-β bei Patienten mit initial hoher IFN-β-Aktivität konnte also nicht gezeigt werden. In der internationalen Literatur gibt es hierzu unterschiedliche Aussagen. Mehrere Arbeitsgruppen postulierten, dass die Wirksamkeit von IFN-β vermindert sei, wenn bereits vor Therapiebeginn Komponenten des IFN-β-Signalweges hochreguliert seien (Van Baarsen et al. 2008, Comabella et al. 2009, Axtell et al. 2010, Bustamante et al. 2011). In anderen Studien konnte diese Beobachtung aber nicht bestätigt werden (Hesse et al. 2010, Van der Voort et al. 2010, Hundeshagen et al. 2012). In dieser Arbeit ist bei den o.g. Patienten kein schlechterer Verlauf registriert worden. Möglicherweise ist die Kohorte jedoch zu klein, um in dieser Frage eine klare Korrelation herzustellen.

Zum Zeitpunkt 1 (nach zwei Tagen) stieg das MX1-Level von acht der übrigen neun Patienten auf ein ähnlich hohes Niveau an. Lediglich eine Patientin zeigte unter der Therapie keine signifikante Expressionssteigerung von MX1. Hierbei handelt es sich um Patientin 1, welche bereits zuvor mit IFN-β 1a s.c. behandelt worden war, die Therapie

jedoch wegen eines Kinderwunsches abgesetzt hatte und erst bei Wiederaufnahme der Therapie in die Studie eingeschlossen wurde. Eine mögliche Erklärung für die fehlende biologische IFN-β-Aktivität als Reaktion auf die Therapie ist die Ausbildung von NAb in der ersten Therapiephase. Diese wurden bei der Patientin jedoch nicht bestimmt. Nach zwei Jahren konnte bei sechs der zwölf Patienten keine erhöhte mRNA-IFN-β-Signatur nachgewiesen werden. Bei zwei dieser sechs Patienten war dies zu erwarten, da sie die Therapie bereits vor der letzten Blutabnahme abgesetzt hatten. Bei den anderen vier Patienten war die Ausbildung von NAb als wahrscheinlich oder gesichert anzunehmen. In zwei Fällen ging die reduzierte IRG-Expression mit deutlicher Krankheitsaktivität einher. Man könnte also postulieren, dass die verminderte biologische Wirksamkeit auch mit verminderter klinischer Wirksamkeit korreliert. Dies stände in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass hohe persistente NAb-Titer zu klinisch relevanter Wirkabschwächung der IFN-β-Therapie führen (Killestein und Polman 2011, Polman et al. 2010, Tomassini et al. 2006). Jedoch hatten auch zwei Patienten mit hohem MX1 Expressionsniveau eine EDSS Progression und in einem Fall auch Schubaktivität im zweiten Jahr. Man kann also nicht den Umkehrschluss ziehen, dass Patienten, die nachweislich ein molekulares Therapieansprechen zeigen, im Verlauf keine weiteren Schübe und keine Progression erfahren. Die höchste Expression von IRG nach zwei Jahren zeigte Patientin 4, welche als einzige Patientin bis zur Beendigung der Therapie im fünften Jahr progressions- und schubfrei war.

FCER1A war das Gen, das in dieser Studie am stärksten zur MX1-Expression negativ korrelierte. Es war zum Zeitpunkt 1 bei allen Patienten herunterreguliert und im Verlauf im Mittel auch weiterhin vermindert exprimiert. Dieses Ergebnis zeigten bereits Mikroarray-Analysen mit IFN-β 1b (Goertsches et al. 2010) und IFN-β 1a i.m. (Hecker et al. 2012). Das Gen kodiert für das Fc-Fragment des IgE-Rezeptors, welcher sich auf Mastzellen und basophilen Granulozyten befindet und eine wichtige Rolle in der Regulation von Hypersensitivität im Sinne einer allergischen Reaktion spielt. Dieser Rezeptor befindet sich jedoch auch auf Monozyten und dendritischen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen durch Aggregation des Rezeptors eine Aktivierung von Nf-κB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer of activated B-cells) induziert werden kann (Kraft et al. 2002). Dabei handelt es sich um einen Regulator von für die Entzündungsreaktion wichtigen Genen. Das bedeutet, dass eine verminderte Inflammation

durch Herunterregulation von FCER1A als Effekt der IFN-β Therapie denkbar ist.

Den herunterregulierten Genen wurde in den bisherigen Studien recht wenig Aufmerksamkeit zuteil. Zu diesen Genen gehört auch Interleukin 8 (IL8), welches in der vorliegenden Studie ebenso wie in einer Studie von Stürzebecher et al. als unter IFN-β-Therapie herrunterreguliert registriert wurde (Stürzebecher et al. 2008). Es handelt sich dabei um ein Mitglied der CXC Chemokin-Familie (Baggiolini, Clark-Lewis 1992). Es wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten sowie auf neutrophile und basophile Granulozyten und geleitet die Entzündungszellen an den Ort der Entzündung (Hoffmann et al. 2002). Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass IL-8 das Einwandern von neutrophilen Granulozyten ins Gehirn triggert und dadurch Schäden an der BBB verursacht (Veldhuis et al. 2003). Die Applikation von IFN-β konnte die Neutrophilen-Infiltration und die Beschädigung der BBB vermindern (Veldhuis et al. 2003). IFN-β könnte so in der Therapie der MS durch Herunterregulation von IL8 dazu beitragen, die Entzündungsreaktion zu vermindern und die Permeabilität der BBB aufrecht zu halten. IL8 beeinflusst neben der Entwicklung und Funktion des Immunsystems außerdem die Regulation der Angiogenese (Li et al. 2003). Des Weiteren bewirkt IL8 eine Hochregulation der Expression von MMP9, eine Wirkung, die ebenfalls durch IFN-β gemindert wird (Veldhuis et al. 2003). Passend dazu zeigt sich MMP9 in dieser Studie herunterreguliert. Dabei handelt es sich um ein proteolytisches Protein der Familie der Matrix-Metalloproteasen, welches bei MS-Kranken erhöht ist und als Krankheitsaktivitätsmarker gilt (Avolio et al. 2003a). MMP9 ist in Umbauprozesse von extrazellulärer Matrix involviert und in der Lage, durch lokale Proteolyse das MBP zu zerschneiden (Proost et al. 1993). Dadurch können Epitope freigelegt werden, welche eine Autoimmunreaktion hervorrufen können. MMP9 spielt ebenfalls eine Rolle in der Leukozytenmigration während der Entzündungsreaktion und wird mit Veränderungen an der BBB in Verbindung gebracht (Mun-Bryce, Rosenberg 1998). Es konnte bereits in anderen Studien eine Herunterregulation von MMP9 durch IFN-β gezeigt werden (Galboiz et al. 2001, Goertsches et al. 2010). Das Transkript zeigt auch in dieser Studie nach einmonatiger Therapie mit IFN-β im Vergleich zur Baseline eine signifikante Verminderung des mRNA-Expressionslevels. Seine Herunterregulation begünstigt die Integrität der BBB (Avolio et al. 2003b). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass MMP9 IFN-β zerschneiden kann und damit zu verminderter Bioverfügbarkeit des

Medikaments führt (Nelissen et al. 2003). Um diesem Effekt entgegen zu wirken, könnte eine Kombinationstherapie von Nutzen sein, die den Effekt von MMP9 auf IFN-β inhibiert. Erste Ergebnisse solcher Studien legen einen positiven Effekt einer Kombinationstherapie nahe (Minagar et al. 2008).

CD163, ein Marker für Makrophagenaktivierung während einer Entzündungsreaktion, zeigte sich bei acht Patienten in der frühen nicht jedoch in der späten Therapiephase hochreguliert und bei vier Patienten stabil ohne signifikante Expressionsveränderung. Hierbei handelte es sich um die vier jüngsten Teilnehmer der Studie, die zur Baseline auch die niedrigsten EDSS-Werte hatten und sich in einer frühen Phase der Erkrankung befanden. Ob die Regulation dieses Gens von der Krankheitsaktivität abhängt oder mit dieser korreliert, sollte in weiteren größeren Studien detailliert untersucht werden.

In der Zellgruppe PBMC findet sich ein Gemisch von T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen und Monozyten (Koike et al. 2003). IRG sind in den verschiedenen Lymphozytenfraktionen unterschiedlich exprimiert (Van Boxel-Desaire et al. 2010). Die Mehrheit der in dieser Studie gefilterten Gene wird von Monozyten exprimiert (Tabelle A1 im Anhang). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Monozyten eine der relevanten Zielzellen für IFN-β darstellen. In weiteren Studien wäre es denkbar, die beschriebenen Gene in Zelltyp-spezifischen Analysen näher zu untersuchen.

Der Vorteil von PBMC als Untersuchungsmaterial ist die relativ geringe Invasivität der Blutentnahme im Vergleich zur Gewinnung von Liquor cerebrospinalis oder Hirngewebe sowie die geringe Materialmenge, die benötigt wird. Die Zeit zwischen Abnahme und Verarbeitung sowie die Separationstechnik und Lagerung kann die Konzentration der Transkriptlevel jedoch verändern und sollte daher standardisiert sein. In dieser Studie erfolgte die Verarbeitung der Proben zwar standardisiert und innerhalb von zwei Stunden, jedoch war der Zeitraum zwischen der letzten IFN-Injektion und der Blutabnahme nicht definiert und konnte damit zwischen wenigen Stunden und zwei Tagen liegen. Heute weiß man jedoch, dass die Genexpression im Tagesverlauf und in den Stunden und Tagen nach der Injektion Schwankungen unterliegt (Gilli et al. 2005, Goertsches et al. 2011). In neueren Transkriptomanalysen wird daher auf einen definierten Abstand zwischen Injektion und Blutentnahme geachtet, um eine noch bessere Vergleichbarkeit der Genexpressionsdaten zu erreichen. Ein Vorteil dieser Studie ist jedoch, dass alle 60

Affymetrix-Chips innerhalb von elf Tagen hybridisiert und gescannt wurden. Das ermöglichte eine einheitliche Qualitätskontrolle und erhöht die Qualität der Daten.

Die zwölf Patienten dieser Studie erhielten das gleiche Medikament mit der gleichen Applikationsform. Die Ergebnisse sind also nicht durch Unterschiede zwischen den IFN-β-Präparaten und den verschiedenen Applikationsformen beeinträchtigt. Daraus resultiert eine hohe Qualität der Daten. Neben der Studie von Annibali et al. stellt die vorliegende Arbeit den einzigen Datensatz einer Transkriptomuntersuchung dar, die ausschließlich mit an RRMS leidenden Patienten unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. durchgeführt wurde (Annibali et al. 2007). Die Expressionsveränderungen wurden über einen im Vergleich zu dieser Studie sehr langen Zeitraum gemessen. In der Arbeitsgruppe um Annibali et al. wurden sieben Patienten zu drei Zeitpunkten (vor Therapiebeginn, nach einem Monat und nach drei Monaten) untersucht, so dass es schwierig ist, die Expressionsdaten mit klinischen Parametern der Patienten zu assoziieren. Auch in der vorliegenden Studie war die Patientenkohorte mit zwölf Patienten recht klein. Die in dieser Studie gewonnen Daten stellen dennoch den größten Datensatz von Expressionsdaten zur Therapie mit IFN-β 1a s.c. dar. Der Datensatz ist außerdem in der Datenbank Gene Expression Omnibus unter der Zugangsnummer GSE33464 öffentlich zugänglich.

5.5 Clustering und Analyse der Genfunktionen

In der Clusteranalyse wurden die gefilterten Gene nach ihren Expressionsveränderungen gruppiert. Die stärkste Veränderung zeigte sich nach einem Monat. Die meisten der 96 Gene fanden sich in Cluster 1. Wie zu erwarten war die Funktion „*Interferon Response*“ unter den Genen überrepräsentiert und war besonders typisch für die Gene in Cluster 1, in welchem sich auch MX1 und ko-regulierte IRG befanden. Die Cluster 3, 4 und 5 beinhalteten Gene, die initial hochreguliert, im Verlauf jedoch wieder auf dem Ausgangsniveau bzw. sogar niedriger exprimiert wurden. Hier scheint es zu Anpassungsvorgängen im Körper zu kommen, bei denen sich nach initialer Expressionsinduktion ein Gleichgewicht der Gentranskription einstellt. In Cluster 2 finden sich einige wenige Gene, die erst später im Verlauf, nach ein bis zwei Jahren, unter der IFN-β-Therapie hochreguliert wurden. Dies kann für eine langfristige Modulation der Immunreaktionen des Körpers durch IFN-β sprechen. Unter den Genen dieser vier Cluster finden sich vor allem solche Gene, die eine Rolle bei Gewebeumbauprozessen,

Angiogenese und Immunreaktion spielen. Bei der Angiogenese kommt es zur Auflösung der extrazellulären Matrix in der Umgebung aussprießender Endothelzellen und zu einem Umbau des umgebenden Gewebes sowie einer Ausdifferenzierung von Zellen. Es wird derzeit postuliert, dass die Angiogenese eine bedeutende Rolle in der Ausbildung von MS-Läsionen spielt (Holley et al. 2010). Im cerebralen Parenchym von MS-Patienten konnten mehr proliferierende Endothelzellen als im Hirnparenchym Gesunder festgestellt werden (Holley et al. 2010). Dies wurde mit einer Progression der Läsionen korreliert (Kirk et al. 2004, Holley et al. 2010). Möglicherweise führt also eine Zunahme der Angiogenese im Bereich der BBB zu einer Zunahme der Permeabilität und damit zu vermehrter Leukozytentransmigration und kann durch IFN-β-vermittelte Herunterregulation von Genen, die die Angiogenese begünstigen, wie IL8, vermindert werden. Durch die IFN-β-Therapie werden Gene, die eine Rolle in der Regulation von Angiogenese spielen, jedoch sowohl hoch- (z.B. CXCL10) als auch herunterreguliert (z.B. MMP9 und IL8). Die Modulation dieses Prozesses durch IFN-β scheint daher sehr komplex zu sein und bedarf weiterführender Studien.

5.6 Genregulatorische Interaktionen

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen von TF und Genen mittels TFBS-Analyse untersucht. Darin zeigte sich, welche TF die transkriptionelle Regulation der gefilterten Gene maßgeblich steuern. Insgesamt waren nach den Voraussagen der drei Datenbanken TFBS für fünf TF-Gruppen in den Promotorregionen der 96 Gene überrepräsentiert. Die Motive der TFBS, an welche die TF binden, sind sich dabei untereinander sehr ähnlich.

IRF1 und IRF2 haben die gleiche DNA-Bindedomäne. Dadurch erkennen sie die gleichen TFBS. IRF1 ist dabei ein Aktivator IFN-regulierter Gene. Bei IRF2 handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor der IRF1-vermittelten Transkriptionsaktivierung, so dass die beiden TF in einem Wettstreit um dieselben TFBS stehen (Savitsky et al. 2010). Überwiegt IRF1 kommt es zu vermehrter Transkription von IRG, bei Überwiegen des IRF2 kommt es zu einer Repression der Gentranskription.

Als weiterer maßgeblicher TF konnte PRDM1 identifiziert werden. PRDM1 bindet an die Promotoren von sowohl hoch- als auch herunterregulierten Genen. Es handelt sich dabei um einen Repressor der IFN-Gen-Expression (Keller, Maniatis 1991). 42 der 96 Gene haben eine vorhergesagte Bindestelle für PRDM1, davon besitzen 37 Gene auch eine

Bindestelle für einen der TF IRF1, IRF7 oder ISGF3, also für aktivierende Transkriptionsfaktoren. Dieses Phänomen spricht dafür, dass PRDM1 seine supprimierende Wirkung durch Interaktion mit aktivierenden TF oder durch kompetitive Bindung an dieselben TFBS entfaltet. Es konnte gezeigt werden, dass PRDM1 durch Histonmodifikation eine Rolle bei der aktiven Stilllegung von Genen, dem sog. Gen-Silencing, spielt (Gyory et al. 2004).

Die TF SMARC (SWI/SNF, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin), DMAP1, NCOR1 und NCOR2 haben eine ähnliche DNA-Bindedomäne und gehören zur Familie der SWI/SNF Proteine, welche über die Modifikation der Chromatinstruktur in der Umgebung bestimmter Gene deren Transkription regulieren. Hierbei kommt es zur Verschiebung von Histonen, welche den abzulesenden DNA-Abschnitt für die RNA-Polymerase freilegen und die Transkription des Gens ermöglichen (Kassabov et al. 2003). Es handelt sich hierbei um einen bisher wenig beachteten Mechanismus zur Regulation der Gentranskription. Weitere Studien sind notwendig, um seine Rolle in der Regulation IFN-β vermittelter Effekte zu beleuchten.

Aus den Ergebnissen dieser Analyse resultierte ein sehr dichtes Netzwerk aus Interaktionen zwischen Genen und TF, das vielfältige Regulationsmechanismen visualisiert. Dies veranschaulicht die komplexen Vorgänge, welche für die Expression der durch IFN-β stimulierten Gene verantwortlich sind und in welche diese Arbeit neue Einblicke liefert. Es gilt darüber hinaus zu beachten, dass die TF ihrerseits über den Signalweg der endogenen und exogenen Interferone aktiviert werden. Dabei entfaltet IFN-β seine Wirkung durch Bindung an den IFNAR Rezeptor 1 und 2, welcher an der Zelloberfläche lokalisiert ist, und aktiviert so zwei zytoplasmatische Tyrosinkinasen (JAK1 und TYK2). Dieser Signalweg induziert über die Aktivierung von TF wie ISGF3 die Expression von IRG. Entsprechend war in dieser Studie der TF STAT1, eine Komponente des ISGF3 Komplexes, auch auf Gen-Ebene hochreguliert. IFN-β führt also auch zu einer Steigerung der Expression des TF, welcher dann seinerseits die Expression der Gene reguliert. Der TF IRF7 fand sich ebenfalls unter den hochregulierten Genen. Dieser TF steht am Ende der Signalkaskade, die zur Induktion von IFN führt (Savitsky et al. 2010). Durch Steigerung dieses Signalweges verstärkt IFN-β seine Wirkung weiter. Die Rezeptoren sowie die über diese Signalkaskade regulierte Aktivität der TF sollten in weiteren Studien näher untersucht werden.

5.7 Biomarker in der MS-Diagnostik

Neben dem Zugewinn an Informationen über die komplexen Wirkmechanismen der IFN-β-Therapie soll das Wissen über die durch IFN-β regulierten Gene helfen, Kandidatengene für Biomarker zu finden. Erschwert wird die Suche nach vor allem prognostischen Biomarkern dadurch, dass das Ansprechen auf IFN-β sehr heterogen und von Patient zu Patient verschieden ist. Es gibt derzeit keinen klinischen oder biologischen Marker, der das individuelle Therapieansprechen eines Patienten vor Therapiebeginn voraussagen kann und der sich im klinischen Alltag etabliert hat. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Black holes im Baseline-MRT mit einer stärkeren Progression im Verlauf verbunden sind (Tomassini et al. 2006). Darüber hinaus ergaben weitere Studien, dass bereits das Genexpressionsmuster vor Therapiebeginn möglicherweise mit einem bestimmten klinischen Verlauf der Patienten korreliert werden kann. Beispielsweise wurde ein niedriges prätherapeutisches IL-10 mit früher Krankheitsverschlechterung in Verbindung gebracht (Hesse et al. 2011). Außerdem wurde eine hohe IFN-β-Signalaktivität vor Therapiebeginn mit einem schlechteren Therapieansprechen im weiteren Verlauf assoziiert (Axtell et al. 2010, Bustamante et al. 2011). Für den individuellen Patienten konnte bisher keine enge Korrelation zwischen klinischem oder biologischem Marker und dem zukünftigen Therapieansprechen hergestellt werden, so dass die Entscheidung, eine IFN-β-Therapie zu beginnen, bisher nicht anhand dieser Kriterien getroffen werden kann.

Ein inzwischen im klinischen Alltag etablierter Biomarker ist der Nachweis von Nab, welche im Verlauf der IFN-β-Therapie entstehen können, durch Bestimmung der MX1-Expression (Deisenhammer et al. 2004). Das Auftreten von NAb ist mit einer verminderten klinischen Wirksamkeit assoziiert (PRISMS Study Group 2001, Tomassini et al. 2006, Boz et al. 2007, Pachner et al. 2009, Polman et al. 2010). Es handelt sich damit um einen Marker, der im klinischen Alltag bei Verdacht auf verminderte Wirksamkeit des Medikaments untersucht werden kann. Bei einem reproduzierbaren positiven Ergebnis sollte ein Therapieabbruch erwogen werden (Farrell 2012). Dieser Marker erlaubt jedoch nicht, bereits vor Therapiebeginn oder in einer sehr frühen Therapiephase Vorhersagen über den weiteren Therapieverlauf zu treffen. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie hatte sich die regelhafte Messung der NAb noch nicht etabliert, einerseits, da einerseits noch kein international akzeptiertes und standardisiertes Testsystem zur Verfügung stand und andererseits die klinische Bedeutung noch nicht sicher evaluiert war.

Sie wäre jedoch mit dem heutigen Wissen bei den Patienten ohne molekulare IFN-β-Response sehr sinnvoll gewesen, um die vermutete NAb-Positivität bei diesen Patienten zu beweisen. In zukünftigen Studien sollte dies unbedingt berücksichtigt werden. Es wird empfohlen die NAb während der Therapie mit IFN-β 1b zwischen dem sechsten und dem zwölften Therapiemonat und bei der Therapie mit IFN-β 1a zwischen dem zwölften und dem 24 Therapiemonat zu testen (Giovannoni et al. 2002).

Aus der Gruppe der IRG wurden weitere Gene als mögliche Kandidaten für Biomarker vorgeschlagen, die unter der Therapie mit IFN-β differentiell exprimiert waren und mit einem bestimmten Therapieansprechen assoziiert wurden. So wurde ein herunterreguliertes IL8 sowie ein früh hochregulierter TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) mit klinisch guten Verläufen assoziiert (Stürzebecher et al. 2003, Wandinger et al. 2003). Keines dieser Kandidatengene konnte jedoch bisher in unabhängigen Studien reproduziert werden. Das Problem von Genen als Biomarker ist, dass sie von sehr vielen endogenen und exogenen Faktoren abhängig sind. Ihre Expression kann im natürlichen Krankheitsverlauf fluktuieren und wird außerdem durch zirkadiane und menstruelle Zyklen beeinflusst (Goertsches und Zettl 2007). Weitere Einflussfaktoren wie Genotyp, Umweltfaktoren und Ernährungsgewohnheiten lassen sich nicht vollständig erfassen. Ein spezifisches Problem des RNA-Profiling ist die Fragilität der mRNA unter Nativbedingungen. Sie degeneriert rasch und muss daher schnell und standardisiert weiterverarbeitet werden, was in dieser Studie auch erfolgt ist. Als Biomarker kommen indessen nicht nur Gene und ihre Transkripte infrage. Als Biomarker sind verschiedene Moleküle und Marker denkbar. Im Blut können verschiedene Targets wie DNA, RNA, Proteine oder Metabolite untersucht werden. Der Nachteil des RNA-Profiling ist, dass ein Intermediärprodukt zwischen DNA und Protein analysiert wird. Bevor aus der RNA ein Protein entsteht, erfolgen noch weitere posttranskriptionelle Regulationsschritte beispielsweise durch microRNA (Angerstein et al. 2012). Hier öffnet sich ein weites Feld für Untersuchungen, welche die Produkte des Transkripts auf Proteinebene und deren Regulationsmechanismen untersuchen könnten. Auch können mit dem RNA-Profiling nur bekannte Gentranskripte, für die eine Sonde auf dem Mikrochip vorhanden ist, gemessen werden. Mutationen und Spleißvarianten werden somit nicht erfasst. Durch die Entwicklung des Next-Generation-Sequencing bietet sich in zukünftigen Untersuchungen die Möglichkeit, diese Varianten zu analysieren (Sánchez-Pla et al. 2012).

6 Zusammenfassung

Interferon-β (IFN-β) ist neben Glatirameracetat derzeit das Medikament der ersten Wahl zur Therapie der schubförmigen MS. Es beeinflusst zahlreiche Immunprozesse im menschlichen Körper. Die genauen Mechanismen, die für den therapeutischen Effekt von IFN-β verantwortlich sind, wurden bisher jedoch nicht vollständig identifiziert. Zwischen den Patienten besteht eine ausgeprägte Heterogenität bezüglich des klinischen Therapieansprechens und der molekularen IFN-β-Antwort. Die Nonresponderrate unter der Therapie mit IFN-β ist mit ca. 30% (Waubant et al. 2003) recht hoch und es gibt derzeit keinen Marker, mit dessen Hilfe im Vorfeld eine Aussage über den Erfolg der Therapie und das Auftreten von Nebenwirkungen getroffen werden kann. So werden Patienten teilweise über einen längeren Zeitraum therapiert und erst nach ein bis zwei Jahren kann retrospektiv ein mangelndes Therapieansprechen bewertet werden. Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch eventuell bereits irreversible Funktionseinschränkungen manifest. Die Transkriptexpression einiger Gene im Blut vor Therapiebeginn wurde bereits vielfach als prädiktiver Biomarker vorgeschlagen (Goertsches et al. 2011, Hecker et al. 2011). Biomarker könnten dazu beitragen, initial eine geeignete Therapie zu wählen und die Antwort auf diese Therapie zu monitoren, um ein Therapieversagen früh zu erkennen (Graber et al. 2011). Dies würde die Entscheidung erleichtern, ob ein Therapiewechsel erfolgen sollte. Bislang konnte jedoch kein prädiktiver Marker in einer unabhängigen Studie reproduziert werden und sich im klinischen Alltag etablieren.

Ziel dieser Arbeit war es, auf der einen Seite den klinischen Verlauf von zwölf MS-Patienten aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. zu evaluieren. Hierzu wurde über einen Studienzeitraum von fünf Jahren regelmäßig der EDSS bestimmt sowie die Schubhäufigkeit dokumentiert. Paraklinisch erfolgten MRT-Untersuchungen und die Messung der evozierten Potentiale. Auf der anderen Seite sollte mittels Transkriptomanalyse die differentielle Genexpression unter der Therapie untersucht werden. Das Genexpressions-Profiling wurde für die zwölf Patienten mit RRMS vor Therapiebeginn und nach zwei Tagen, einem Monat, einem Jahr und zwei Jahren unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. durchgeführt. Durch die Analyse von TFBS in den Promotorregionen der unter Therapie hoch- bzw. herunterregulierten Gene, sollten außerdem die Regulationsmechanismen, die der Genexpression zugrunde liegen, näher beleuchtet werden, um das Verständnis der molekularen Wirkweise von IFN-β zu

vertiefen.

Bereits vor Therapiebeginn waren die Patienten dieser Kohorte mit einem mittleren EDSS von 2,3 relativ deutlich betroffen. Die Abbruchrate der Therapie betrug nach fünf Jahren fünf von zwölf und ist mit der Abbruchrate anderer Studien vergleichbar. Gründe für den Abbruch waren Nebenwirkungen, Noncompliance und Kinderwunsch in je einem Fall und eine mangelnde Wirksamkeit in zwei Fällen. Dabei konnte in einem Fall der Nachweis von NAb als Ursache für die verminderte Wirksamkeit nachgewiesen werden. Im Studienverlauf von fünf Jahren zeigten alle adhärenten Patienten eine Krankheitsprogression und/oder Schubaktivität. Nach den in dieser Studie verwendeten Kriterien waren damit nach fünf Jahren alle Patienten Nonresponder. Im klinischen Alltag ist es jedoch teilweise schwer zu entscheiden, wann ein Patient nicht mehr von der Therapie profitiert und ob ein Therapiewechsel vorgenommen werden sollte. Die Schubfrequenz konnte auch in den Zulassungsstudien keine Schubfreiheit erzielen. Ein Schubereignis unter Therapie bedeutet daher nicht, dass der Patient nicht auf die Therapie anspricht. Es wird deutlich, dass die hier verwendeten Kriterien für den klinischen Alltag nicht günstig sind, um ein Therapieversagen festzustellen. NAb können eine Ursache für vermindertes Therapieansprechen sein. Sie sollten daher in zukünftigen Studien bei allen Patienten bestimmt werden. In den MRT-Untersuchungen konnte trotz deutlicher Krankheitsprogression bei einigen Patienten insgesamt nur wenig bildmorphologische Progredienz beobachtet werden. Auffällig war außerdem, dass mit Ausnahme von zwei Patienten alle Patienten Nebenwirkungen hatten, welche auch im späteren Krankheitsverlauf auftraten und persistierten.

Im Fokus des RNA-Profilings standen Gene, die unter der Therapie mit IFN-β in PBMC differentiell exprimiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass IFN-β einen deutlichen Effekt auf die Expression von Genen in PBMC hat. Von über 18000 gemessenen Genen wurden 96 Gene als signifikant hochreguliert oder als herunterreguliert identifiziert. Das Expressionsmuster war unter den Patienten sehr heterogen. Bei sechs der zwölf Patienten kam es im zweiten Jahr nach Studienbeginn zu einer Verminderung der Expression von MX1 und anderen IRG, was in zwei Fällen mit fehlender oder verminderter Medikamenteninjektion und in vier Fällen mit gemessenen oder anzunehmenden NAb erklärt werden konnte. Anhand des Expressionsmusters konnte so eine verminderte molekulare Wirkung des IFN-β wie beim Auftreten von NAb oder bei Noncompliance

indirekt nachvollzogen werden. Viele der hochregulierten Gene (n=74) sind in der Literatur bereits als IFN-induzierte Gene beschrieben worden. Andere hier gefilterte Gene, insbesondere Gene, die nur sehr früh (nach zwei Tagen) oder nur spät (nach zwei Jahren) hochreguliert wurden, wurden bisher noch nicht im Detail beschrieben. Unter den herunterregulierten Genen konnten FCER1A, IL8 und MMP9 bestätigt werden. Die Mehrheit der gefilterten Gene wird von Monozyten exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass Monozyten eine der relevanten Zielzellen der IFN-β Therapie sind. In dieser Arbeit konnte nicht bestätigt werden, dass eine prätherapeutisch hohe IFN-Signatur, die bei drei Patienten beobachtet werden konnte, mit einem verminderten Therapieansprechen assoziiert ist.

Anhand der überrepäsentierten Genfunktionen konnte festgestellt werden, dass die gefilterten Gene besonders an der Modulation der Immunantwort, der Regulation der Entzündungsantwort durch Chemotaxis sowie an Umbauprozessen der extrazellulären Matrix und an der Angiogenese beteiligt sind. Möglicherweise spielen letztere Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Modulation der Permeabilität der BBB durch IFN-β.

In der Untersuchung der TF konnten PRDM1 und TF der SMARC-Familie neben den bekannten Mitgliedern der IRF-Familie als weitere TF identifiziert werden, die die genregulatorischen Effekte der Therapie vermitteln. SMARC haben über das Chromatin-Remodelling einen Einfluss darauf, welche DNA-Abschnitte für die Initiierung der Transkription freigelegt werden. Es zeigte sich insgesamt ein sehr dichtes Netzwerk aus TF und Genen, welches auf eine komplexe Regulation der IFN-β-Antwort auf molekularer Ebene schließen lässt.

Da das Gentranskript jedoch noch weitere Modifikationen bis zur Proteintranslation erfährt, ergibt sich hier ein erheblicher Forschungsbedarf zur Analyse der post-transkriptionellen Genregulation durch beispielsweise microRNA sowie der Untersuchung von Mutationen und Spleißvarianten. Auf der Grundlage von Transkriptom-untersuchungen, die IFN-regulierte Gene beschrieben haben, bietet sich die Untersuchung der jeweiligen Proteine mit der Frage an, ob das Produkt des Gens auf Proteinebene gleichsinnig unter der Therapie verändert wird. Die Transkriptomanalyse wurde bislang an sehr kleinen Patientenkohorten durchgeführt, da sie einerseits sehr kostenintensiv und andererseits logistisch sehr komplex ist. Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse

bereichern das Verständnis über die molekularen Mechanismen, die der IFN-β-Antwort zugrunde liegen. Die Aufgabe zukünftiger Genexpressionsstudien ist es, diese Erkenntnisse in größeren Kohorten gezielt zu verifizieren sowie das Wissen über die Funktionen der IRG zu erweitern.

7 Literaturverzeichnis

Aguirre-Cruz L, Flores-Rivera J, De La Cruz-Aguilera DL, Rangel-López E, Corona T: Multiple sclerosis in Caucasians and Latino Americans. *Autoimmunity* 2011, 44:571-5.

Aharoni R, Vainshtein A, Stock A, Eilam R, From R, Shinder V, Arnon R: Distinct pathological patterns in relapsing-remitting and chronic models of experimental autoimmune enchephalomyelitis and the neuroprotective effect of glatiramer acetate. *J Autoimmun* 2011, 37:228-41.

Angerstein C, Hecker M, Paap BK, Koczan D, Thamilarasan M, Thiesen HJ, Zettl UK: Integration of MicroRNA Databases to Study MicroRNAs Associated with Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 2012, 45:520-35.

Annibali V, Di Giovanni S, Cannoni S, Giugni E, Bomprezzi R, Mattei C, Elkahloun A, Coccia EM, Alfò M, Orzi F, Ristori G, Salvetti M: Gene expression profiles reveal homeostatic dynamics during interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 2007, 40:16-22.

Apel A, Klauer T, Zettl UK: Stress and progression in multiple sclerosis. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2006, 74:567-74.

Ascherio A, Munger KL: Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007a, 61:288-99.

Ascherio A, Munger KL: Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 2007b, 61:504-13.

Ascherio A, Munger KL, Simon KC: Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010, 9:599-612.

Avolio C, Ruggieri M, Giuliani F, Liuzzi GM, Leante R, Riccio P, Livrea P, Trojano M: Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. *J Neuroimmunol* 2003a, 136:46-53.

Avolio C, Giuliani F, Liuzzi GM, Ruggieri M, Paolicelli D, Riccio P, Livrea P, Trojano M: Adhesion molecules and matrix metalloproteinases in Multiple Sclerosis: effects induced by Interferon-beta. *Brain Res Bull* 2003b, 61:357-64.

Axtell RC, De Jong BA, Boniface K, Van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, Naves R, Han M, Zhong F, Castellanos JG, Mair R, Christakos A, Kolkowitz I, Katz L, Killestein J, Polman CH, De Waal Malefyt R, Steinman L, Raman C: T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 2010, 16:406-12.

Baggiolini M, Clark-Lewis I: Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992, 307:97-101.

Banwell B, Krupp L, Kennedy J, Tellier R, Tenembaum S, Ness J, Belman A, Boiko A, Bykova O, Waubant E, Mah JK, Stoian C, Kremenchutzky M, Bardini MR, Ruggieri M, Rensel M, Hahn J, Weinstock-Guttman B, Yeh EA, Farrell K, Freedman M, Iivanainen M, Sevon M, Bhan V, Dilenge ME, Stephens D, Bar-Or A: Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 2007, 6:773-81.

Beck J, Rondot P, Catinot L, Falcoff E, Kirchner H, Wietzerbin J: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand* 1988, 78:318-23.

Bielekova B, Martin R: Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004, 127:1463-78.

Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, Lee S, Plavina T, Scanlon JV, Snadrock A, Bozic C: Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2012, 366:1870-80.

Börnsen L, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS, Sellebjerg F: Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2011, 17:32-42.

Boz C, Oger J, Gibbs E, Grossberg SE; Neurologists of the UBC MS Clinic: Reduced effectiveness of long-term interferon-beta treatment on relapses in neutralizing antibody-positive multiple sclerosis patients: a Canadian multiple sclerosis clinic-based study. *Mult Scler* 2007, 13:1127-37.

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M: Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001, 29:365-71.

Bustamante MF, Fissolo N, Río J, Espejo C, Costa C, Mansilla MJ, Lizasoain I, Moro MA, Carmen Edo M, Montalban X, Comabella M: Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-β in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011, 70:634-45.

Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquill LR, Maloni H, McFarland HF: VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* 1997, 49:1111-6.

Comabella M, Lünemann JD, Río J, Sánchez A, López C, Julià E, Fernández M, Nonell L, Camiña-Tato M, Deisenhammer F, Caballero E, Tortola MT, Prinz M, Montalban X, Martin R: A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 2009, 132:3353-65.

Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, Hartung H, Seeldrayers P, Sørensen PS, Rovaris M, Martinelli V, Hommes OR; Early Treatment of Multiple Sclerosis Study Group: Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 2001, 357:1576-82.

Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A, Elovaara I, Fazekas F, Hartung HP, Hillert J, King J, Komoly S, Lubetzki C, Montalban X, Myhr KM, Ravnborg M, Rieckmann P, Wynn D, Young C, Filippi M; PreCISe study group: Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009, 374:1503-11.

Compston A, Coles A: Multiple sclerosis. *Lancet* 2008, 372:1502-17.

Costello K, Kennedy P, Scanzillo J: Recognizing nonadherence in patients with multiple sclerosis and maintaining treatment adherence in the long term. *Medscape J Med* 2008, 10:225.

Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG: The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol* 2006, 410:3-28.

Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A: Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 2004, 251 Suppl 2:II31-9.

Derynck R, Devos R, Remaut E, Saman E, Stanssens P, Tavernier J, Volckaert G, Content J, De Clercq E, Fiers W: Isolation and characterization of a human fibroblast interferon gene and its expression in Escherichia coli. *Rev Infect Dis* 1981, 3:1186-95.

De Sa JC, Airas L, Bartholome E, Gringoriadis N, Mattle H, Oreja-Guevara C, O`Riordan J, Sellebjerg F, Stankoff B, Vass K, Walczak A, Wiendl H, Kieseier BC: Symptomatic therapy in multiple sclerosis: a review for a multimodal approach in clinical practice. *Ther Adv Neurol Disord* 2011, 4:139-68.

Dhib-Jalbut S, Marks S: Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010, 74 Suppl 1:S17-24.

Di Pauli F, Reindl M, Ehling R, Schautzer F, Gneiss C, Lutterotti A, O'Reilly E, Munger K, Deisenhammer F, Ascherio A, Berger T: Smoking is a risk faktor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008, 14:1026-30.

Dreszer TR, Karolchik D, Zweig AS, Hinrichs AS, Raney BJ, Kuhn RM, Meyer LR, Wong M, Sloan CA, Rosenbloom KR, Roe G, Rhead B, Pohl A, Malladi VS, Li CH, Learned K, Kirkup V, Hsu F, Harte RA, Guruvadoo L, Goldman M, Giardine BM, Fujita PA, Diekhans M, Cline MS, Clawson H, Barber GP, Haussler D, James Kent W: The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2011. *Nucleic Acids Res* 2012, 40(Database issue):D918-23.

Durelli L, Verdun E, Barbero P, Bergui M, Versino E, Ghezzi A, Montanari E, Zaffaroni M; Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial Study Group: Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple

sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet* 2002, 359:1453-60.

European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS: Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1998, 352:1491-7.

Falcon S, Gentleman R: Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 2007, 23:257-8.

Farrell RA, Marta M, Gaeguta AJ, Souslova V, Giovannoni G, Creeke PI: Development of resistance to biologic therapies with reference to IFN-β. *Rheumatology (Oxford)* 2012, 51:590-0.

Ferrari F, Bortoluzzi S, Coppe A, Sirota A, Safran M, Shmoish M, Ferrari S, Lancet D, Danieli GA, Bicciato S: Novel definition files for human GeneChips based on GeneAnnot. *BMC Bioinformatics* 2007, 8:446.

Filippi M, Rocca MA, Barkhof F, Brück W, Chen JT, Comi G, DeLuca G, De Stefano N, Erickson BJ, Evangelou N, Fazekas F, Geurts JJ, Lucchinetti C, Miller DH, Pelletier D, Popescu BF, Lassmann H; Attendees of the Correlation between Pathological MRI findings in MS workshop: Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2012, 11:349-60.

Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Zettl UK, Rieckmann P: Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. *Dtsch Ärztebl Int* 2008, 105:113-9.

Freedman MS, Patry DG, Grand´Maison F, Myles ML, Paty DW, Selchen DH; Canadian MS Working Group: Treatment optimization in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 2004, 31:157-68.

Freedman MS, Francis GS, Sanders EA, Rice GP, O´Connor P, Comi G, Duquette P, Metz L, Murray TJ, Bouchard JP, Abramsky O, Pelletier J, O´Brian F; Once Weekly Interferon beta-1alpha for Multiple Sclerosis Study Group; University of British Columbia MS/MRI Research Group: Randomized study of once-weekly interferon beta-1la therapy in relapsing multiple sclerosis: three-year data from the OWIMS study. Mult Scler 2005, 11:41-5.

Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N, Rawashdeh H, Miller A: Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon-beta therapy in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2001, 50:443-51.

Gale CR, Martyn CN: Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 1995, 47:425-48.

Garcia-Merino JA, Sanchez AJ: Basic mechanisms of action of fingolimod in relation to multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2012, 55:31-7.

Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Di Sapio A, Capobianco M, Bertolotto A: Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005, 158:195-203.

Giovannoni G, Munschauer FE 3rd, Deisenhammer F: Neutralising antibodies to interferon beta during the treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002, 73:465-9.

Goertsches R, Zettl UK: MS therapy research applying genome-wide RNA profiling of peripheral blood. *Int MS J* 2007, 14:98-107.

Goertsches RH, Hecker M, Koczan D, Serrano-Fernandez P, Moeller S, Thiesen HJ, Zettl UK: Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN-beta-1b treatment in relapsing remitting MS. *Pharmacogenomics* 2010, 11:147-61.

Goertsches RH, Zettl UK, Hecker M: Sieving treatment biomarkers from blood gene-expression profiles: a pharmacogenomic update on two types of multiple sclerosis therapy. *Pharmacogenomics* 2011, 12:423-32.

Goretti B, Portaccio E, Zipoli V, Razzolini L, Amato MP: Coping strategies, cognitive impairment, psychological variables and their relationship with quality of life in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2010, 31:227-30.

Graber J, Zhan M, Ford D, Kursch F, Francis G, Bever C, Panitch H, Calabresi PA, Dhib-Jalbut S: Interferon-beta-1a induces increases in vascular cell adhesion molecule: implications for its mode of action in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005, 161:169-76.

Graber JJ, Dhib-Jalbut S: Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011, 305:1-10.

Greer JM, McCombe PA: Role of gender in multiple sclerosis: clinical effects and potential molecular mechanisms. *J Neuroimmunol* 2011, 234:7-18.

Guthrie TC, Nelson DA: Influence of temperature changes on multiple sclerosis: critical review of mechanisms and research potential. *J Neurol Sci* 1995, 129:1-8.

Gyory I, Wu J, Fejér G, Seto E, Wright KL: PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol* 2004, 5:299-308.

Haahr S, Höllsberg P: Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol* 2006, 16:297-310.

Haines JD, Inglese M, Casaccia P: Axonal damage in multiple sclerosis. *Mt Sinai J Med* 2011, 78:231-43.

Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T; Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002, 360:2018-25.

Havla J, Gerdes LA, Meinl I, Krumbholz M, Faber H, Weber F, Pellkofer HL, Hohlfeld R, Kümpfel T: De-escalation from natalizumab in multiple sclerosis: recurrence of disease activity despite switching to glatiramer acetate. *J Neurol* 2011, 258:1665-9.

Hawkes CH: Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Mult Scler* 2007, 13:610-5.

Hecker M, Goertsches RH, Engelmann R, Thiesen HJ, Guthke R: Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy. *BMC Bioinformatics* 2009, 10:262.

Hecker M, Paap BK, Goertsches RH, Kandulski O, Fatum C, Koczan D, Hartung HP, Thiesen HJ, Zettl UK: Reassessment of blood gene expression markers for the prognosis of relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One* 2011, 6:e29648.

Hecker M, Goertsches RH, Fatum C, Koczan D, Thiesen HJ, Guthke R, Zettl UK: Network analysis of transcriptional regulation in response to intramuscular interferon-β-1a multiple sclerosis treatment. *Pharmacogenomics J* 2012, 12:134-46.

Hein T, Hopfenmüller W: Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. Nervenarzt 2000, 71:288-94.

Henze T: Symptomatic therapy of multiple sclerosis. *Nervenarzt* 2004, 1:2-39.

Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS: Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. *Neurology* 2009, 73:372-7.

Hesse D, Krakauer M, Lund H, Søndergaard HB, Langkilde A, Ryder LP, Sorensen PS, Sellebjerg F: Breakthrough disease during interferon [beta] therapy in MS: No signs of impaired biologic response. *Neurology* 2010, 74:1455-62.

Hesse D, Krakauer M, Lund H, Søndergaard HB, Limborg SJ, Sørensen PS, Sellebjerg F: Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon-β in multiple sclerosis? *Eur J Neurol* 2011, 18:266-72.

Hickey WF: Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991, 1:97-105.

Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M: Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002, 72:847-55.

Holley JE, Newcombe J, Whatmore JL, Gutowski NJ: Increased blood vessel density and endothelial cell proliferation in multiple sclerosis cerebral white matter. *Neurosci Lett* 2010, 470:65-70.

Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, Angerstein C, Kandulski O, Fatum C, Hartmann C, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK: Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J Neuroinflammation* 2012, 9:140.

IFNB MS Study Group: Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1996, 47:889-94.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, et al.: Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011, 476:214-9.

Jacobs L, Johnson KP: A brief history of the use of interferons as treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1994, 51:1245-52.

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH, Alam JJ, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownscheidle CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty DS, Kinkel RP, Mass MK, Munschauer FE 3rd, Priore RL, Pullicino PM, Scherokman BJ, Whitham RH, et al.; The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG): Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996, 39:285-94.

Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownscheidle CM, Murray TJ, Simonian NA, Slasor PJ, Sandrock AW: Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 2000, 343:898-904.

Joensen P: Multiple sclerosis incidence in the Faroer Islands 1986-2007. *Acta Neurol Scand* 2010, 121:348-53.

Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB, Vollmer T, Weiner LP, Wolinsky JS: Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995, 45:1268-76.

Jongen PJ, Ter Horst AT, Brands AM: Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Minerva Med* 2012, 103:73-96.

Kappos L, Weinshenker B, Pozzilli C, Thompson AJ, Dahlke F, Beckmann K, Polman C, McFarland H; European (EU-SPMS) Interferon beta-1b in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Trial Steering Committee and Independent Advisory Board; North American (NA-SPMS) Interferon beta-1b in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Trial Steering Committee and Independent Advisory Board: Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials. *Neurology* 2004, 63:1779-87.

Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Barkhof F, Radü EW, Metzig C, Bauer L, Lanius V, Sandbrink R, Pohl C; BENEFIT Study Group: Long-term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial. *Lancet Neurol* 2009, 8:987-97.

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P; FREEDOMS Study Group: A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010, 362:387-401.

Kassabov SR, Zhang B, Persinger J, Bartholomew B: SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell* 2003, 11:391-403.

Keller AD, Maniatis T: Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. *Genes Dev* 1991, 5:868-79.

Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, Hillert J, Piehl F, Olsson T: Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler* 2011, 17:335-43.

Killestein J, Polman CH: Determinants of interferon β efficacy in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011, 7:221-8.

Kirk S, Frank JA, Karlik S: Angiogenesis in multiple sclerosis: is it good, bad or an epiphenomenon? *J Neurol Sci* 2004, 217:125-30.

Koch-Henriksen N, Sørensen PS, Christensen T, Frederiksen J, Ravnborg M, Jensen K, Heltberg A, Kristensen O, Stenager E, Petersen T, Hansen T; Danish Multiple Sclerosis Group: A randomized study of two interferon-beta treatments in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 2006, 66:1056-60.

Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: Mikroarray analysis identifies interferon beta-regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003, 139:109-18.

Kraft S, Novak N, Katoh N, Bieber T, Rupec RA: Aggregation of the high-affinity IgE receptor Fc(epsilon)RI on human monocytes and dendritic cells induces NF-kappa B activation. *J Invest Dermatol* 2002, 118:830-7.

Kurtzke JF: Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983, 33:1444-52.

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H: Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005, 128:2705-12.

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C: Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001, 7:115-21.

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF: The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 2007, 17:210-8.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK: IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003, 170:3369-76.

Link H, Huang YM: Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006, 180:17-28.

Mazdeh M, Afzali S, Jaafari MR: The therapeutic effect of Avonex, Rebif and Betaferon on EDSS and relapse in multiple sclerosis: a comparative study. *Acta Med Iran* 2010, 48:83-8.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF,

Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS: Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001, 50:121-7.

Mendes A, Sá MJ: Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. *Arq Neuropsiquiatr* 2011, 69:536-43.

Mikol DD, Barkhof F, Chang P, Coyle PK, Jeffery DR, Schwid SR, Stubinski B, Uitdehaag BM; REGARD study group: Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. *Lancet Neurol* 2008, 7:903-14.

Minager A, Alexander JS, Schwendimann RN, Kelley RE, Gonzalez-Toledo E, Jimenez JJ, Mauro L, Jy W, Smith SJ: Combination therapy with interferon beta-1a and doxycycline in multiple sclerosis: an open-label trial. *Arch Neurol* 2008, 65:199-204.

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK: Animal models of multiple sclerosis-potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 2010, 92:386-404.

Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG), Wiendl H, Toyka KV, Rieckmann P, Gold R, Hartung HP, Hohlfeld R: Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J Neurol* 2008, 225:1449-63.

Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA: The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 1994, 44:11-5.

Mun-Bryce S, Rosenberg GA: Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 1998, 274:R1203- 11.

Nave KA, Trapp BD: Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 2008, 31:535-61.

Nelissen I, Martens E, Van den Steen PE, Proost P, Ronsse I, Opdenakker G: Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon-beta and is a target for immunotherapy. *Brain* 2003, 126:1371-81.

O'Connor P, Filippi M, Arnason B, Comi G, Cook S, Goodin D, Hartung HP, Jeffery D, Kappos L, Boateng F, Filippov V, Groth M, Knappertz V, Kraus C, Sandbrink R, Pohl C, Bogumil T; BEYOND Study Group, O'Connor P, Filippi M, Arnason B, Cook S, Goodin D, Hartung HP, Kappos L, Jeffery D, Comi G: 250 microg or 500 microg interferon beta-1b versus 20 mg glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a prospective, randomised, multicentre study. *Lancet Neurol* 2009, 8:889-97.

O'Rourke KE, Hutchinson M: Stopping beta-interferon therapy in multiple sclerosis: an analysis of stopping patterns. *Mult Scler* 2005, 11:46-50.

Owens T: The enigma of multiple sclerosis: imflammation and neurodegeneration cause heterogenous dysfunction and damage. *Curr Opin Neurol* 2003, 16:259-65.

Paap BK, Hundeshagen AS, Hecker M, Zettl UK: An Inventory of Short Term and Long Term Changes in Gene Expression Under Interferon β Treatment of Relapsing Remitting MS Patients. *Curr Pharm Des* 2012. [Epub ahead of print]

Pachkov M, Erb I, Molina N, van Nimwegen E: SwissRegulon: a database of genome-wide annotations of regulatory sites. Nucleic Acids Res 2007, 35:D127-31.

Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D: MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. *Mol Diagn* 2003, 7:17-25.

Pachner AR, Warth JD, Pace A, Goelz S; INSIGHT investigators: Effect of neutralizing antibodies on biomarker response to interferon beta: the INSIGHT study. *Neurology* 2009, 73:1493-500.

Panitch H, Goodin DS, Francis G, Chang P, Coyle PK, O'Connor P, Monaghan E, Li D, Weinshenker B; EVIDENCE Study Group. EVidence of Interferon Dose-response: Europian North American Compartative Efficacy; University of British Columbia MS/MRI Research Group: Randomized comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology* 2002, 59:1496-506.

Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H: Remyelination is extensive in a

subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 2006, 129:3165-72.

Patti F, Pappalardo A, Florio C, Politi G, Fiorilla T, Reggio E, Reggio A: Effects of interferon beta-1a and -1b over time: 6-year results of an observational head-to-head study. *Acta Neurol Scand* 2006, 113:241-7.

Patti F: Optimizing the benefit of multiple sclerosis therapy: the importance of treatment adherence. *Patient Prefer Adherence* 2010, 4:1-9.

Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC: Is hypovitaminosis D one of the enviromental risk factors for multiple sclerosis? *Brain*. 2010, 133:1869-88.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005, 58:840-6.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; AFFIRM Investigators: A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006, 354:899-910.

Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Killestein J, McFarland HF, Oger J, Pachner AR, Petkau J, Reder AT, Reingold SC, Schellekens H, Sørensen PS: Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010, 9:740-50.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011, 69:292-302.

PRISM study group: Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 1998, 352:1498-504.

PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: PRISM-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 2001, 56:1628-36.

Proost P, Van Damme J, Opdenakker G: Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 192:1175-81.

Pucci E, Giuliani G, Solari A, Simi S, Minozzi S, Di Pietrantonj C, Galea I: Natalizumab for relapsing remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database* Syst Rev 2011, CD007621.

Rieckmann P, Heidenreich F, Sailer M, Zettl UK, Zessack N, Hartung HP, Gold R: Treatment de-escalation after mitoxantrone therapy: results of a phase IV, multicentre, open-label, randomized study of subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2012, 5:3-12.

Río J, Porcel J, Téllez N, Sánchez-Betancourt A, Tintoré M, Arévalo MJ, Nos C, Montalban X: Factors related with treatment adherence to interferon beta and glatiramer acetate therapy in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005a, 11:306-9.

Río J, Tintoré M, Nos C, Téllez N, Galán I, Montalban X: Interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. An eight years experience in a specialist multiple sclerosis centre. *J Neurol* 2005b, 252:795-800.

Río J, Nos C, Tintoré M, Téllez N, Galán I, Pelayo R, Comabella M, Montalban X: Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006, 59:344-52.

Robertson NP, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DA: Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology* 1996a, 47:347-52.

Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA: Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 1996b, 119:449-55.

Robertson G, Bilenky M, Lin K, He A, Yuen W, Dagpinar M, Varhol R, Teague K, Griffith OL, Zhang X, Pan Y, Hassel M, Sleumer MC, Pan W, Pleasance ED, Chuang M, Hao H, Li YY, Robertson N, Fjell C, Li B, Montgomery SB, Astakhova T, Zhou J,

Sander J, Siddiqui AS, Jones SJ: cisRED: a database system for genome-scale computational discovery of regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 2006, 34(Database issue):D68-73.

Rosati G: The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 2001, 22:117-39.

Rovira A, León A: MR in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: an overview. *Eur J Radiol* 2008, 67:409-12.

Rudick RA, Simonian NA, Alam JA, Campion M, Scaramucci JO, Jones W, Coats ME, Goodkin DE, Weinstock-Guttman B, Herndon RM, Mass MK, Richert JR, Salazar AM, Munschauer FE 3rd, Cookfair DL, Simon JH, Jacobs LD: Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon beta-1a in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology* 1998, 50:1266-72.

Rudick RA: Evolving concepts in the pathogenesis of multiple sclerosis and their therapeutic implications. *J Neuroophtalmol* 2001, 21:279-83.

Rudick RA, Cutter G, Reingold S: The multiple sclerosis functional composite: a new clinical outcome measure for multiple sclerosis trails. *Mult Scler* 2002, 8:359-65.

Rudick RA, Polman CH: Current approaches to the identification and management of breakthrough disease in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2009, 8:545-59.

Ruggieri RM, Settipani N, Viviano L, Attanasio M, Giglia L, Almasio P, La Bella V, Piccoli F: Long-term interferon-beta treatment for multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2003, 24:361-4.

Ruggieri M, Avolio C, Livrea P, Trojano M: Glatiramer acetate in multiple sclerosis: a review. *CNS Drug Rev* 2007, 13:178-91.

Sadovnick AD, Remick RA, Allen J, Swartz E, Yee IM, Eisen K, Farquhar R, Hashimoto SA, Hooge J, Kastrukoff LF, Morrison W, Nelson J, Oger J, Paty DW: Depression and multiple sclerosis. *Neurology* 1996, 46:628-32.

Sánchez-Pla A, Reverter F, Ruíz de Villa MC, Comabella M: Transcriptomics: mRNA and alternative splicing. *J Neuroimmunol* 2012, 248:23-31.

Savitsky D, Tamura T, Yanai H, Taniguchi T: Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother* 2010, 59:489-510.

Sellner J, Schirmer L, Hemmer B, Mühlau M: Radiologically isolated syndrome: multiple sclerosis based solely on MRI findings? *Nervenarzt* 2010, 81:1208-17.

Smith KJ: Sodium channels and multiple sclerosis: roles in symptom production, damage and therapy. *Brain Pathol* 2007, 17:230-42.

Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T: Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 2011, 27:431-2.

Sospedra M, Martin R: Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005, 23:683-747.

Stürzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF: Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 2003, 126:1419-29.

Stuke K, Flachenecker P, Zettl UK, Elias WG, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Rieckmann P: Symptomatology of MS: results from the German MS Registry. *J Neurol* 2009, 256:1932-5.

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group: Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993, 43:655-61.

Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M Montalban X, De Sá J: Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997, 120:1085-96.

Tintoré M: New options for early treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009, 277 Suppl 1:S9-11.

Tomassini V, Paolillo A, Russo P, Giugni E, Prosperini L, Gasperini C, Antonelli G, Bastianello S, Pozzilli C: Predictors of long-term clinical response to interferon beta therapy in relapsing multiple sclerosis. *J Neurol* 2006, 253:287-93.

Tremlett HL, Oger J: Interrupted therapy: stopping and switching of the beta-interferons prescribed for MS. *Neurology* 2003, 61:551-4.

Trojano M, Avolio C, Liuzzi GM, Ruggieri M, Defazio G, Liguori M, Santacroce MP, Paolicelli D, Giuliani F, Riccio P, Livrea P: Changes of serum sICAM-1 and MMP-9 induced by rIFNbeta-1b treatment in relapsing- remitting MS. *Neurology* 1999, 53:1402-8.

Tubaro A, Puccini F, De Nunzio C, Digesu GA, Elneil S, Gobbi C, Khullar V: The Treatment of Lower Urinary Tract Symptoms in Patients With Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Curr Urol Rep* 2012 [Epub ahead of print].

Tumani H, Deisenhammer F, Giovannoni G, Gold R, Hartung HP, Hemmer B, Hohlfeld R, Otto M, Stangel M, Wildemann B, Zettl UK: Revised McDonald criteria: the persisting importance of cerebrospinal fluid analysis. *Ann Neurol* 2011, 70:520.

Vallittu AM, Erälinna JP, Ilonen J, Salmi AA, Waris M: MxA protein assay for optimal monitoring of IFN-beta bioactivity in the treatment of MS patients. *Acta Neurol Scand* 2008, 118:12-7.

Van Baarsen LG, Vosslamber S, Tijssen M, Baggen JM, Van der Voort LF, Killenstein J, Van der Pouw Kraan TC, Polman CH, Verweij CL: Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PloS One* 2008, 3:e1927.

Van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, Ransohoff RM, Jacobberger JW, Stark GR: Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta. *J Immunol* 2010, 185:5888-99.

Van der Voort LF, Vennegoor A, Visser A, Knol DL, Uitdehaag BM, Barkhof F, Oudejans CB, Polman CH, Killestein J: Spontaneous MxA mRNA level predicts relapses in patients with recently diagnosed MS. *Neurology* 2010, 75:1228-33.

Veldhuis WB, Floris S, van der Meide PH, Vos IM, de Vries HE, Dijkstra CD, Bär PR, Nicolay K: Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and

attenuates blood-brain barrier disruption. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003, 23:1060-9.

Von Herrath MG, Fujinami RS, Whitton JL: Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nat Rev Microbiol* 2003, 1:151-7.

Wandinger KP, Lünemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundström E, Ehrlich S, Wernecke KD, Volk HD, Zipp F: TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 2003, 361:2036-43.

Watkins NA, Gusnanto A, de Bono B, De S, Miranda-Saavedra D, Hardie DL, Angenent WG, Attwood AP, Ellis PD, Erber W, Foad NS, Garner SF, Isacke CM, Jolley J, Koch K, Macaulay IC, Morley SL, Rendon A, Rice KM, Taylor N, Thijssen-Timmer DC, Tijssen MR, van der Schoot CE, Wernisch L, Winzer T, Dudbridge F, Buckley CD, Langford CF, Teichmann S, Göttgens B, et al.; Bloodomics Consortium: A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells. *Blood* 2009, 113:e1-9.

Waubant E, Vukusic S, Gignoux L, Dubief FD, Achiti I, Blanc S, Renoux C, Confavreux C: Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 2003, 61:184-9.

Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC: The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 1989, 112:133-46.

Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, Pineda AA, Stevens LN, Rodriguez M: A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 1999, 46:878-86.

Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, Zhong H, Duan SR, Bi S: Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2012, 244:94-6.

Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, Trapp BD: Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, 61:23-32.

Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J: Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002, 3:research0062.

Zamvil SS, Steinman L: Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phase of multiple sclerosis. *Neuron* 2003, 38:685-8.

Zettl UK, Tumani H: Cerebrospinal fluid and multiple sclerosis. Blackwell Publishing, Oxford 2005.

Zettl UK, Goertsches RH: Therapy monitoring in patients with multiple sclerosis based on transcriptomic analysis. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2009, 1:64-8.

8 Internetdokumente

[Stand 16.08.2012]

ArrayExpress: Datenbank des European Bioinformatics Institute (Datensatz E-TABM-633): http://www.ebi.ac.uk/- arrayexpress/experiments/E-TABM-633

cisRED: cis-regulatory element database: http://www.cisred.org/human9/

Cytoscape: An Open Source Platform for Complex Network Analysis and Visualization: http://www.cytoscape.org

DGN 2012: Leitlininen der DGN – Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose: http://www.dgn.org/neurologische-leitlinien-online/inhalte-a-z/2026-neu.diagnostik-und-therapie-der-multiplen-sklerose.html

DKFZ: Genomics and proteomics core facility – Affymetrix Technology: http://www.dkfz.de/-gpcf/24.html

Gene Expression Omnibus-Datenbank (GEO): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: http://www.genome.jp/kegg/

SABiosciences, a QUIAGEN company. Complete list of SABiosciences Pathway-focused Arrays: http://www.sabioscience.com/ArrayList.php

SwissRegulon: http://www.swissregulon.unibas.ch

UCSC Genome Browser: http://genome.ucsc.edu

9 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
BBB	Blood Brain Barrier
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
cRNA	complementary Ribonucleic Acid
CDF	Custom Chip Definition File
CIS	Clinically Isolated Syndrome
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DMD	Disease Modifying Drugs
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent-assay
EP	Evozierte Potentiale
FS	Funktionelles System
GA	Glatirameracetat
Gd	Gadolinium
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IRF	Interferon Regulationsfaktor
i.m.	intramuskulär
IRG	Interferon-reguliertes Gen
i.v.	intravenös

KD	Krankheitsdauer
KM	Kontrastmittel
MBP	Myelin Basic Protein
MEP	Motorisch Evozierte Potentiale
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
NAb	Neutralizing Antibodies
NR	Nonresponder
NW	Nebenwirkungen
OKB	Oligoklonale Banden
OE	Obere Extremität
Pat	Patient
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PML	Progressive Multifokale Leukencephalopathie
PPMS	Primary Progressive MS
PWM	Position-weight-Matrix
R	Responder
RIS	Radiologically Isolated Syndrome
RNA	Ribonucleic Acid
RRMS	Relapsing Remitting MS
s.c.	subkutan
SD	Standard Deviation

SyD	Symptomdauer
SSEP	Somatosensibel Evozierte Potentiale
SPMS	Secondary Progressive MS
SW	Spannweite
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestelle
TH-Zellen	T-Helfer Zellen
UE	Untere Extremität
VEP	Visuell Evozierte Potentiale
VF	Verlaufsform
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Abbildungsverzeichnis

11 Tabellenverzeichnis

12 Anhang

Tabelle A1, A-C: **Tabelle der 96 unter der Therapie mit IFN-β hoch- und herunter-regulierten Gene**

Die Tabelle zeigt die gefilterten 96 Gene, deren Expression in den PBMC der zwölf MS-Patienten unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. moduliert wurde. In alphabetischer Reihenfolge werden die Gensymbole (ganz links) und die Genbezeichnungen aufgeführt sowie die Zeile in Abbildung 4 (Kapitel 4.4), in der die Daten zu den jeweiligen Genen dargestellt sind. Mit den Farben rot und grün werden die Expressionsveränderungen zwischen der Baseline-Expression und der Expression zu den Zeitpunkten t1 (zwei Tage), t2 (ein Monat), t3 (ein Jahr) und t4 (zwei Jahre) dargestellt, wobei rot eine Hochregulation und grün eine Herunterregulation bedeutet. Hellrot und hellgrün bedeutet hier, dass die Signalintensität zum jeweiligen Zeitpunkt im Mittel bei den zwölf Patienten höher bzw. niedriger als zur Baseline war, das Filterkriterium jedoch nicht erfüllt wurde (siehe Kapitel 3.4.3). In den folgenden Spalten wird für jedes Gen die Zugehörigkeit zu einer Gengruppe der beiden Datenbanken KEGG und SABioscience durch ein gelbes Feld visualisiert. Die Datenbanken definieren Gengruppen, in denen Gene, die in gleiche Prozesse im Körper involviert sind oder gleiche Funktionen oder Lokalisationen haben, zusammengefasst werden. Einige der gefilterten Gene finden sich hierbei in mehreren Gengruppen. Welche Genfunktionen, Signalwege oder Prozesse unter den gefilterten Genen überrepräsentiert sind, ist der Tabelle 10 in Kapitel 4.5 zu entnehmen. Des Weiteren stellt die Tabelle ebenfalls mit einem gelben Feld dar, für welche Transkriptionsfaktoren (TF) Bindestellen in den Promotorregionen der einzelnen Gene vorhanden sind. Einige Gene haben dabei in ihrem Promotor mehrere der überrepräsentierten TF-Bindestellen, andere Gene, beispielsweise IL8, haben hingegen für keine der fünf TF-Gruppen eine Bindestelle. Ganz rechts veranschaulichen die gelben Felder, in welchen Zell-Subpopulationen die Gene im Haematlas-Datensatz als exprimiert gefunden wurden. Für vier Gene gab es keine Expressionsdaten in diesem Datensatz, was durch ein „ - “ verdeutlicht wird.

Tabelle A1, A: **Unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. differentiell exprimierte Gene**

Offizielles Gen-Symbol	Offizielle Genbezeichnung	Zeile in der Heatmap	Regulation t1	Regulation t2	Regulation t3	Regulation t4	KEGG database: RIG-I-Like receptor and signaling pathway	KEGG database: Complement and Coagulation cascade	SABioscience array: Interferon alpha, beta Response	SABioscience: Interferon (IFN) and Receptor	SABioscience: Inflammatory Response and Autoimmunity 384E	SABioscience: Chemokines & Receptors	SABioscience: Dendritic & Antigen Presenting Cell	SABioscience: Angiogenesis	SABioscience: JAK / STAT Signaling Pathway	SABioscience: HIV Infection and Host Response	TFBS für IRF1,IRF2	TFBS für IRF7	TFBS für ISGF3	TFBS für DMAP1,NCOR1,NCOR2,SMARC	TFBS für PRDM1	Exprimiert in B-Lymphozyten	Exprimiert in Monozyten	Exprimiert in NK-Zellen	Exprimiert inTc-Lymphozyten	Exprimiert in Th-Lymphozyten
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	1	Up	Up	Up																					
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	60	Up	Up																						
ARG1	arginase, liver	71	Up																							
C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain	63	Up																							
C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain	64	Up																							
C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain	62	Up																							
C3AR1	complement component 3a receptor 1	61	Up	Up																						
CABP5	calcium binding protein 5	81		Down																						
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	51		Up	Up																					
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	50	Up	Up	Up																					
CD163	CD163 molecule	72	Up																							
CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	75		Down																						
CLU	clusterin	87		Down																						
CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	40	Up	Up	Up																					
CMTM2	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2	79		Down																						
CMTM5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	88		Down																						
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	53	Up	Up																						
CYP4F3	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3	78		Down																						
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	32	Up	Up																						
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	14	Up	Up																						
DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	15		Up																						
DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	18		Up																						
EGR1	early growth response 1	56			Up																					
EGR2	early growth response 2	55				Up																				
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	13	Up	Up	Up																					
ENSG00000183700		95				Down	-	-																		
EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	35	Up	Up	Up																	-	-	-	-	-
FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	93	Down																			-	-	-	-	-
FFAR2	free fatty acid receptor 2	70	Up																			-	-	-	-	-
G0S2	G0/G1switch 2	92				Down																				
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	47	Up																							
GGTA1	glycoprotein, alpha-galactosyltransferase 1	82		Down	Down																					

Tabelle A1, B: **Unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. differentiell exprimierte Gene**

Offizielles Gen-Symbol	Offizielle Genbezeichnung	Zeile in der Heatmap	Regulation t1	Regulation t2	Regulation t3	Regulation t4	KEGG database: RIG-I-Like receptor and signaling pathway	KEGG database: Complement and Coagulation cascade	SABioscience array: Interferon alpha, beta Response	SABioscience: Interferon (IFN) and Receptor	SABioscience: Inflammatory Response and Autoimmunity 384E	SABioscience: Chemokines & Receptors	SABioscience: Dendritic & Antigen Presenting Cell	SABioscience: Angiogenesis	SABioscience: JAK / STAT Signaling Pathway	SABioscience: HIV Infection and Host Response	TFBS für TFBS für IRF1,IRF2	TFBS für TFBS für IRF7	TFBS für TFBS für ISGF3	TFBS für TFBS für DMAP1,NCOR1,NCOR2,SMARC	TFBS für TFBS für PRDM1	Exprimiert in B-Lymphozyten	Exprimiert in Monozyten	Exprimiert in NK-Zellen	Exprimiert in Tc-Lymphozyten	Exprimiert in Th-Lymphozyten
GP9	glycoprotein IX (platelet)	85		Down																						
GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	65		Up																						
HERC5	hect domain and RLD 5	33	Up	Up	Up																					
HERC6	hect domain and RLD 6	12	Up	Up	Up																					
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	3	Up	Up																						
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	43	Up	Up	Up																					
IFI35	interferon-induced protein 35	8	Up	Up																						
IFI44	interferon-induced protein 44	41	Up	Up	Up	Up																				
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	36	Up	Up	Up	Up																				
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	5	Up	Up	Up																					
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	21	Up	Up	Up																					
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	31	Up	Up	Up																					
IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	23	Up	Up	Up																					
IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	25	Up	Up																						
IL8	interleukin 8	96				Up																				
IRF7	interferon regulatory factor 7	27	Up	Up	Up																					
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	24	Up	Up	Up																					
ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	90		Down																						
JUP	junction plakoglobin	54		Up																						
KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	76		Down																						
KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	67	Up																							
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	16		Up																						
LAP3	leucine aminopeptidase 3	44	Up	Up																						
LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	6	Up	Up	Up																					
LILRA3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3	59	Up																							
LOC391020	interferon induced transmembrane protein pseudogene	45		Up																						
LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	37	Up	Up	Up																					
MGAM	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)	74	Up	Down																						
MMP25	matrix metallopeptidase 25	73	Up																							
MMP9	matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	77		Down																						
MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	2	Up	Up	Up																					
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	39	Up	Up	Up																					

Tabelle A1, C: **Unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. differentiell exprimierte Gene**

Offizielles Gen-Symbol	Offizielle Genbezeichnung	Zeile in der Heatmap	Regulation t1	Regulation t2	Regulation t3	Regulation t4	KEGG database: RIG-I-Like receptor and signaling pathway	KEGG database: Complement and Coagulation cascade	SABioscience array: Interferon alpha, beta Response	SABioscience: Interferon (IFN) and Receptor	SABioscience: Inflammatory Response and Autoimmunity 384E	SABioscience: Chemokines & Receptors	SABioscience: Dendritic & Antigen Presenting Cell	SABioscience: Angiogenesis	SABioscience: JAK / STAT Signaling Pathway	SABioscience: HIV Infection and Host Response	TFBS für IRF1,IRF2	TFBS für IRF7	TFBS für ISGF3	TFBS für DMAP1,NCOR1,NCOR2,SMARC	TFBS für PRDM1	Exprimiert in B-Lymphozyten	Exprimiert in Monozyten	Exprimiert in NK-Zellen	Exprimiert inTc-Lymphozyten	Exprimiert in Th-Lymphozyten
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	11	Up	Up	Up																					
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	91		Down																						
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	17	Up	Up	Up																					
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	10	Up	Up	Up																					
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	26	Up	Up	Up																					
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	30	Up	Up	Up																					
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	28	Up	Up																						
PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	9	Up	Up	Up																					
PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1	80		Down																						
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	38	Up	Up																						
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	52		Up																						
PROS1	protein S (alpha)	83		Down																						
RPS23	ribosomal protein S23	94	Down																							
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	22	Up	Up	Up																					
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	34	Up	Up																						
SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	20	Up	Up																						
SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	19	Up	Up	Up																					
SCO2	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	7	Up	Up	Up																					
SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	48	Up	Up																						
SH3BGRL2	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	86	Up	Down																						
SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	4	Up	Up	Up																					
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	66	Up																							
STAP1	signal transducing adaptor family member 1	58				Up																				
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	46	Up	Up																						
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A	57			Up	Up																				
TMEM140	transmembrane protein 140	68	Up																							
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	69	Up																							
TRBV27	T cell receptor beta variable 27	84		Down																						
TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	89		Down																						
TYMP	thymidine phosphorylase	49		Up																						
XAF1	XIAP associated factor 1	42	Up	Up	Up																					
ZBP1	Z-DNA binding protein 1	29	Up	Up																						

13 Danksagung

Hiermit danke ich allen Personen, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Uwe Zettl, für die Bereitstellung des Themas, die Diskussion der Ergebnisse und insbesondere für die engmaschige Betreuung während des Schreibprozesse.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Dr. Robert Goertsches, der mich an das interessante Thema herangeführt hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Dirk Koczan und Frau Ildikó Tóth für die Durchführung der Mikrochipanalysen am Institut für Immunologie der Universität Rostock.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Hecker für die Datenauswertung der Mikrochipdaten und die Unterstützung bei der molekularbiologischen Analyse.

Frau Christa Tiffert danke ich für die Patientenbetreuung und für die Bereitstellung der klinischen Patientendaten, die ich in dieser Arbeit ausgewertet habe.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die unermüdliche emotionale Unterstützung, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

_____

Christiane Hartmann
Rostock, den 26.08.2012

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christiane Hartmann, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Bei der Auswertung der Daten haben mich die in der Danksagung genannten Personen unterstützt. Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Abteilung oder entsprechender Einrichtung einer Hochschule eingereicht.

_____

Christiane Hartmann
Rostock, den 26.08.2012

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. R. Benecke

Thesen zur Dissertation:

Langfristige Therapie mit Interferon-β 1a subkutan: klinischer Verlauf und Genexpressionsveränderungen im Blut von Patienten mit schubförmig verlaufender Multipler Sklerose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des

akademischen Grades Doktor der Medizin

der medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Christiane Hartmann

aus Rostock

Rostock, 2012

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische, demyelinisierende und axonal läsionierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), welche neurologische Funktionsausfälle zur Folge hat. Der Krankheitsverlauf ist zwischen den Patienten sehr heterogen und im Einzelfall nicht vorherzusagen.
2. Derzeit gibt es keine kurative Therapie der MS. Interferon-β (IFN-β) konnte in großen multizentrischen Studien die Schubaktivität um ca. 30 % reduzieren. Neben Glatirameracetat stellt es aktuell das Mittel der Wahl zur Behandlung der schubförmigen MS dar. Das individuelle Therapieansprechen ist dabei nicht vorhersehbar. Etwa ein Drittel der Patienten zeigt trotz Therapie eine andauernde Krankheitsaktivität mit gleichbleibender oder sogar höherer Schubaktivität als vor Therapiebeginn.
3. Die genaue Wirkweise von IFN-β und die genauen Mechanismen, die dem therapeutischen Effekt zugrunde liegen, sind noch nicht zur Gänze verstanden. Zwischen den Patienten besteht eine ausgeprägte Heterogenität bezüglich der pharmakodynamischen Antwort auf IFN-β und des klinischen Therapieansprechens.
4. Bisher gibt es im klinischen Alltag keinen etablierten Marker, der das individuelle Therapieansprechen vor Therapiebeginn voraussagen kann. Daher werden Patienten teilweise über einen längeren Zeitraum therapiert, bevor retrospektiv das Therapieansprechen beurteilt werden kann. Bei vermindertem Ansprechen können dann jedoch bereits irreversible Funktionseinschränkungen eingetreten sein.
5. Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist, das individuelle Ansprechen von zwölf MS-Patienten unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. zu evaluieren sowie durch die Analyse der differentiell exprimierten Gene in PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) der einzelnen Patienten ein verbessertes Verständnis der molekularen Wirkungsweise des Medikaments zu erlangen. Außerdem sollen durch die Analyse von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (TF) in den Promotorregionen dieser Gene die Regulationsmechanismen, die der veränderten Genexpression zugrunde liegen, näher beleuchtet werden.
6. Von den zwölf Patienten der Studie brachen fünf die Therapie während des Studienzeitraums von fünf Jahren ab. Gründe hierfür waren in je einem Fall Nebenwirkungen, Noncompliance und ein Kinderwunsch. Zwei Patienten mussten

die Therapie wegen vermuteter mangelnder Wirksamkeit beenden, wobei in einem Fall neutralisierende Antikörper (NAb) nachgewiesen werden konnten.

7. Zwischen den Patienten besteht eine ausgeprägte Heterogenität im Hinblick auf den Krankheitsverlauf und das klinische Bild. Der mittlere EDSS stieg innerhalb des Studienzeitraums von fünf Jahren von 2,3 auf 3,7 an. Es finden sich jedoch neben Patienten mit deutlicher Funktionseinschränkung auch Patienten ohne permanente Einschränkung, was sich in einem EDSS von 0 ausdrückt. Mit einer Ausnahme war bei allen adhärenten Patienten eine Schubaktivität zu verzeichnen.

8. Die häufigsten Nebenwirkungen unter der Therapie mit IFN-β 1a s.c. waren Rötungen an der Injektionsstelle und Grippe-ähnliche Symptome. Die Nebenwirkungen traten bei zehn von zwölf Patienten auf und waren überwiegend leicht- bis mittelgradig und persistierend.

9. Es konnte gezeigt werden, das IFN-β die Expression einer Vielzahl von Genen sowohl kurzfristig als auch langfristig beeinflusst. Ein Großteil der Gene wird hoch-, einige Gene werden jedoch auch herunterreguliert. Das Expressionsmuster der Gene war dabei unter den Patienten sehr heterogen.

10. Unter den herunterregulierten Genen fanden sich FCER1A, IL8 und MMP9, welche involviert sind in Umbauprozesse extrazellulärer Matrix und die Angiogenese sowie die Regulation der Entzündungsantwort durch Chemotaxis. Die Angiogenese ist möglicherweise ein biologischer Prozess über welchen IFN-β die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke moduliert und die Leukozytenmigration zu den Entzündungsherden im ZNS vermindert.

11. Mit einer Promotoranalyse konnten PRDM1 (PR domain zinc finger protein 1) und TF der SMARC-Familie (SWI/SNF, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin) neben den bekannten Mitgliedern der IRF-Familie (Interferon-Regulations-Faktor) als weitere TF identifiziert werden, welche die genregulatorischen Effekte der Therapie vermitteln. Es zeigte sich insgesamt ein sehr dichtes Netzwerk aus Interaktionen zwischen TF und Genen, was auf eine komplexe Regulation der IFN-Antwort auf molekularer Ebene schließen lässt.

12. Die molekulare und die klinische Wirksamkeit von IFN-β wird in einigen Patienten durch das Ausbilden von NAb reduziert. Korrespondierend sind die Interferon-regulierten Gene im Blut der NAb-positiven Patienten niedrig exprimiert. NAb stellen einen prognostischen Biomarker dar und sollten in Zukunft regelmäßig bei

allen Patienten unter der Therapie mit IFN-β kontrolliert werden.

13. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse bereichern das Verständnis über die molekularen Mechanismen, die der IFN-β-Therapie zugrunde liegen. Da Gentranskripte jedoch noch weitere Modifikationen bis zur Proteintranslation erfahren, ergibt sich ein erheblicher Forschungsbedarf zur Analyse der posttranskriptionellen Regulation sowie für Untersuchungen mit der Frage, ob die Genexpression auf Proteinebene gleichsinnig durch die Therapie verändert wird.